

Revista Latinoamericana de

Patología Clínica

MEDICINA DE LABORATORIO

Volumen 60, Número 1 / Enero-Marzo 2013

Editorial

**La actualización en Patología Clínica
y los próximos Congresos en México**

**New observations on the ecology and epidemiology
of *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis
2. Ecological niches of *S. schenckii* and zoonotic outbreaks**

**La mioglobina como marcador del infarto agudo
del miocardio en pacientes con síndrome coronario agudo**

**Inflamación subclínica en 18,310 donadores de sangre
fumadores y no fumadores: la cuenta de leucocitos de sangre
periférica como marcador de inflamación**

**Determinación de intervalos de referencia para química clínica
en población mexicana**

**Autoanticuerpos antitiroglobulina en la determinación
de tiroglobulina durante el seguimiento de pacientes
operados de carcinoma diferenciado de tiroides**

Leptospirosis; un problema de salud pública

Órgano Oficial:

Asociación Latinoamericana de
Patología Clínica/Medicina
de Laboratorio (ALAPAC/ML)

Federación Mexicana de
Patología Clínica (FEMPAC)



Disponible en versión completa en:

www.medigraphic.com/patologiaclinica

1

Revista Latinoamericana de
Patología Clínica
MEDICINA DE LABORATORIO

ÍNDICE

- Editorial**
- 4 **La actualización en Patología Clínica y los próximos Congresos en México**
Enrique Navarrete Cadena
- 5 **Nuevas observaciones sobre la ecología y epidemiología del *Sporothrix schenckii* y la esporotricosis**
2. Nichos ecológicos de *S. schenckii* y brotes zoonóticos
Teodoro Carrada-Bravo, Miguel Iván Olvera-Macías
- 25 **La mioglobina como marcador del infarto agudo del miocardio en pacientes con síndrome coronario agudo**
José Raúl Dopico Paz, Yamilka Valdés Macola, LLudénich Osoria Mengana, Isabel Giralдино Falero, Enrique Abraham Marcel
- 33 **Inflamación subclínica en 18,310 donadores de sangre fumadores y no fumadores: la cuenta de leucocitos de sangre periférica como marcador de inflamación**
Marco Aurelio Vences-Avilés, Lucía Gama-Valdez
- 43 **Determinación de intervalos de referencia para química clínica en población mexicana**
Gabriela Olay Fuentes, Pablo Díaz Piedra, Ricardo Hernández Gómez, R Daniel Cervantes-Villagrana, José Miguel Presno-Bernal, Luz Elena Alcántara Gómez
- 52 **Autoanticuerpos antitiroglobulina en la determinación de tiroglobulina durante el seguimiento de pacientes operados de carcinoma diferenciado de tiroides**
Sinconegui Belkys, Marrero María Teresa, Oliva Juan Perfecto, Martínez Aldo Ínez, Velasco Milagros
- 57 **Leptospirosis; un problema de salud pública**
Rafael García-González, Angélica Reyes-Torres, David Basilio-Hernández, Maritoña Ramírez-Pérez, Beatriz Rivas-Sánchez

CONTENTS

- Editorial**
- 4 **Update in Clinical Pathology and the coming Conferences in Mexico**
Enrique Navarrete Cadena
- 5 **New observations on the ecology and epidemiology of *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis**
2. Ecological niches of *S. schenckii* and zoonotic outbreaks
Teodoro Carrada-Bravo, Miguel Iván Olvera-Macías
- 25 **Myoglobin as a marker of acute myocardial infarction in patients with acute coronary syndromes**
José Raúl Dopico Paz, Yamilka Valdés Macola, LLudénich Osoria Mengana, Isabel Giralдино Falero, Enrique Abraham Marcel
- 33 **Subclinical inflammation in 18,310 blood donors smoker and nonsmokers: The white blood cell count as inflammation marker**
Marco Aurelio Vences-Avilés, Lucía Gama-Valdez
- 43 **Determination of reference intervals for clinical chemistry in the Mexican population**
Gabriela Olay Fuentes, Pablo Díaz Piedra, Ricardo Hernández Gómez, R Daniel Cervantes-Villagrana, José Miguel Presno-Bernal, Luz Elena Alcántara Gómez
- 52 **Antithyroglobulin autoantibodies in the determination of thyroglobulin during the follow-up of patients operated for thyroid differentiated carcinoma**
Sinconegui Belkys, Marrero María Teresa, Oliva Juan Perfecto, Martínez Aldo Ínez, Velasco Milagros
- 57 **Leptospirosis; a public health problem**
Rafael García-González, Angélica Reyes-Torres, David Basilio-Hernández, Maritoña Ramírez-Pérez, Beatriz Rivas-Sánchez

Revista Latinoamericana de

Patología Clínica

MEDICINA DE LABORATORIO

DIRECTORIO

Editor: Enrique Navarrete Cadena

Coeditores: Arturo M. Terrés Speziale, Alberto Zamora Palma

COMITÉ EDITORIAL

Área de Bacteriología

Dra. Silvia Giono Cerezo

Investigador Titular. SNI: Nivel I. Departamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN, México, D.F.

Área de Banco de Sangre y Medicina Transfusional

Dr. Héctor Rodríguez-Moyado

Ex-Director del Banco Central de Sangre CMN Siglo XXI, IMSS. Miembro Honorario de la Asociación Mexicana de Medicina Transfusional, A.C. Miembro Titular de la Asociación Mexicana para el Estudio de la Hematología, México, D.F.

Área de Inmunología

Dr. Fernando Antonio Santoscoy Tovar

Jefe del Área de Laboratorio y del Departamento de Microbiología: Bacteriología, Micología, Parasitología y Virología, Unidad de Patología Clínica, Guadalajara, Jalisco, México. Miembro e Inspector del College of American Pathologists (CAP). Miembro de la American Society for Microbiology, de la American Society for Clinical Pathology y de la Clinical Ligand Assay Society.

Área de Hematología

Dra. Blanca Stéffano de Perdomo

Doctor en Medicina, DM, Postgrado en Patología Clínica. Coordinadora del Comité de Expertos de Normalización y Control de Calidad en Hemostasis y Trombosis del Grupo Latinoamericano de Hemostasis y Trombosis (CLAHT). Coordinadora del Programa Nacional Uruguayo de Evaluación Externa de Calidad en Hematología (CECC). Director Técnico del Centro de Estudios e Investigación de Hemostasis y Trombosis (Laboratorio HYGEA, Montevideo, Uruguay).

Área de Bioética y Normativa

Dr. Eduardo García Solís

Médico, Patólogo Clínico, Diplomado en Inmunología Clínica. Director Operativo de la Comisión de Bioética del Estado de Campeche. Académico Numerario de la Academia Nacional de Investigación Clínica. Miembro de la Asociación Mexicana de Medicina Interna, Capítulo Campeche. Miembro de la Sociedad Yucateca de Cardiología. Miembro del Colegio Médico de Campeche, México.

Dr. Jorge Manuel Sánchez González

Médico, Patólogo Clínico, Acad. de la Academia Nacional de Cirugía.

Área de Genética Médica

Dr. Fabio Salamanca Gómez

Médico Genetista, Coeditor de Archives of Medical Research y de Gaceta Médica de México. Profesor Titular de Cursos de Genética en la UNAM y en varias universidades más. Miembro Numerario de la Academia Nacional

de Medicina, la Academia Mexicana de Ciencias, la Academia Mexicana de Cirugía y la Academia Mexicana de Pediatría. Coordinador de Investigación en Salud, IMSS, México.

Área de Infectología

Dr. Gustavo Barriga Angulo

Jefe de Laboratorio del Hospital de Infectología, Centro Médico «La Raza», Instituto Mexicano del Seguro Social, D.F., México.

Área de Micología Médica

Dr. Arturo Rubén López Martínez

Profesor Titular C de Tiempo Completo. Médico Cirujano, Doctorado en Ciencias Biomédicas. Nivel de Sistema Nacional de Investigadores II. Jefe del Laboratorio de Micología Médica, Facultad de Medicina, UNAM, D.F. México.

Área de Parasitología Médica

Dr. Werner Apt Baruch

Departamento de Medicina Interna-Gastroenterología. Especialidad en Parasitología. Presidente de la Sociedad Chilena de Parasitología (SOCHIPA). Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Campus Sur, Santiago de Chile, Chile.

Dr. Raúl Romero Cabello

Médico Infectólogo del Hospital General de México, Profesor Titular de Parasitología y Micología, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM. Miembro de 20 asociaciones médicas, nacionales e internacionales, de Pediatría, Infectología y Parasitología. Ex-Presidente de la Sociedad Mexicana de Parasitología y de la Federación Latinoamericana de Parasitología.

Área de Bioquímica Clínica

Dr. José Roberto Barba Evia

Médico Especialista en Patología Clínica. Subdirector de Auxiliares de Diagnóstico, Hospital Regional de Alta Especialidad de la Península de Yucatán, IMSS. Profesor de la Facultad de Química, Universidad Autónoma de Yucatán y de la Universidad Anáhuac Mayab, de las cátedras de Patología Clínica, Parasitología Médica y Hematología Clínica.

Área de Gestión de Calidad

Dr. Alberto Zamora Palma

Médico Especialista en Patología Clínica. Experto en Sistemas de Gestión de la Calidad, UNAM. Miembro del College of American Pathologists Standards (CAP), Estándares de la Joint Commission International.

Dr. Arturo Manlio Terrés Speziale

Médico Especialista en Patología Clínica, con estudios de postgrado revalidados ante el National Board of Medical Examiners de los EUA. Diplomados en Administración Estratégica de Servicios de Salud, Aseguramiento y Acreditación de la Calidad (JCAH), Bioestadística Avanzada Six Sigma, Reingeniería de Sistemas, Control de Calidad Analítica, Informática y Telemática, entre otros.



ÓRGANO OFICIAL DE LA FEDERACIÓN
MEXICANA DE PATOLOGÍA CLÍNICA
(FEMPAC)

ÓRGANO OFICIAL DE LA ASOCIACIÓN
LATINOAMERICANA DE PATOLOGÍA CLÍNICA/MEDICINA
DE LABORATORIO (ALAPAC/ML)

AGRUPACIONES DE PATOLOGÍA CLÍNICA Y DIRECTIVAS ACTUALES:

Mesa Directiva de la Federación Mexicana de Patología Clínica (FEMPAC): 2012-2014

Presidente: Dr. José Luis Hernández Montiel
Vicepresidente: Dr. Jorge Manuel Olmedo Castillo
Secretario-tesorero: Dra. Lourdes Barba Villavicencio

Agrupaciones integrantes de FEMPAC

Asociación Mexicana de Patología Clínica, A.C.
Presidente: Dr. Manuel Canseco Álvarez
Asociación Oaxaqueña de Patología Clínica.
Presidente: Dra. Angelina Aburto Acosta
Colegio de Médicos Patólogos Clínicos de Jalisco, A.C.
Presidente: Dr. José Manuel Cortés García
Colegio de Patólogos Clínicos del Centro de la República Mexicana, A.C.
Presidente: Dr. Rafael Franco Santillán
Colegio Médico de Patólogos Clínicos del Noreste de México.
Presidenta: Dra. Ana Cecilia Pruneda Santoy
Colegio Poblano de Patología Clínica, A.C.
Presidenta: Dra. María de los Ángeles Pavón Vargas
Colegio Médico de Patólogos Clínicos de Veracruz.
Presidente: Dr. Álvaro Machorro Castañón

La Federación Mexicana de Patología Clínica es miembro de la Asociación Latinoamericana de Patología Clínica/Medicina de Laboratorio (ALAPAC/ML), y de la World Association of Societies of Pathology (Anatomic and Clinical) [WASPALM].

Asociación Latinoamericana de Patología Clínica/Medicina de Laboratorio Junta Directiva 2012-2014

Presidente: Dr. Walter Alallón (Uruguay)
Presidente Alterno: Dr. Murilo Resende Melo (Brasil)
Secretario Permanente: Dr. José Carreón Moldiz (Bolivia)
Secretaria: Dra. Raquel Ballesté (Uruguay)
Secretario Alterno: Dr. Mauricio Cárbia (Uruguay)
Tesorera: Dra. Gabriela Moreira (Uruguay)

Vicepresidencias

Actividades Gremiales y Coordinación: Dr. Pedro Cladera (Uruguay)
Dr. Enrique Abraham Marcel (Cuba)
Control de Calidad y Acreditación: Dr. Klever Sáenz Flor (Ecuador)
Dra. Blanca Steffano (Uruguay)
Relaciones Industriales: Dr. Luis Narváez Grijalva (Ecuador)
Dr. José Luis Hernández Montiel (México)
Dr. Edgar Muñoz Atahualpa (Perú)
Planes Futuros: Dr. Julio Sempértegui Vega (Ecuador)
Dr. Manuel Leiva Beraun (Perú)
Actividades Científicas y Educación: Dra. Rosa María García Escamilla (México)
Dr. José Luis Vega (Perú)
Relaciones Internacionales: Dra. Marilene Resende Melo (Brasil)
Dr. Guillermo Aguilar Arenas (México)
Dr. Ramón Suárez Zaldú (Uruguay)
Editor de la Revista de Patología Clínica: Dr. Enrique Navarrete Cadena (México)
Representante de la WASPALM: Dr. Murilo Resende Melo (Brasil)

Directiva de la World Association of Societies of Pathology & Laboratory Medicine 2011-2013

Presidente: Gamze Mocan Kuzey (Turquía)
Secretario Tesorero: Jagdish Butany (Canadá)
Presidente Electo: Lai-Meng Looi (Malasia)
Ex presidente: Michael Oellerich (Alemania)
Director General de Latinoamérica: Murilo Melo (Brasil)
Director General de Norteamérica: Fred Rodriguez (Estados Unidos)
Director Adicional: Roberto Ruiz Arenas (México)



Imagen de la portada: Células plasmáticas tumorales de la circulación periférica (leucemia de células plasmáticas) 100X. Imagen publicada en la pág. 137 del número 3, julio-septiembre de 2012, en el artículo *Valor del fenotipaje mediante citometría de flujo en la confirmación del diagnóstico de leucemia de células plasmáticas* de Anwar Hussein Aidroos y cols.

La Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio es el órgano oficial de difusión de la Federación Mexicana de Patología Clínica, A.C. y de la Asociación Latinoamericana de Patología Clínica/Medicina de Laboratorio. Los conceptos que en ella aparecen son responsabilidad exclusiva de los autores.

Se publica trimestralmente. Suscripción anual en México \$ 400.00, para otros países US\$80.00. Tiraje de 2,000 ejemplares. Derechos reservados conforme a la Ley. Certificado de Licitud de Título Núm. 3023, Certificado de Licitud de Contenido Núm. 1929. Derecho de Autor Núm. 557-86. Publicación periódica. Permiso de Correos PP09-0478.

La Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio está indexada en: Medigraphic Literatura Biomédica; www.medigraphic.com/patologiaclinica, Latindex, Centro Nacional de Información y Documentación en Salud (CENIDS), PERIODICA UNAM, Anuario Bibliográfico de Investigación en Salud del IMSS (ABISA), Literatura Latinoamericana en Salud (LILACS), Centro Latinoamericano y del Caribe en Ciencias de la Salud (BIREME), São Paulo, Brasil. Toda correspondencia o remesa deberá dirigirse al Editor de la Revista: Dr. Enrique Navarrete Cadena, E-mail: revista.patologiaclinica@gmail.com

Arte, diseño, composición tipográfica, pre prensa, impresión y acabado por Graphimedic, S.A. de C.V., Tels. 8589-8527 al 31. E-mail: emyc@medigraphic.com. Impreso en México.

Disponibile en versión completa en Medigraphic-Literatura Biomédica: www.medigraphic.org.mx

Editorial

La actualización en Patología Clínica y los próximos Congresos en México

Este artículo puede ser consultado en versión completa en:
www.medigraphic.com/patologiaclinica

Enrique Navarrete Cadena

Editor

4

Iniciamos ahora nuestro segundo año con el título oficial de *Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, gracias a la suma de apoyo conjunto de las directivas ALAPAC/ML, FEMPAC, y autores de los diversos países que están colaborando con sus escritos.

En varias ocasiones hemos referido la importancia que representan las actividades educativas de formación, especialización y actualización en el área de Patología Clínica. A través de ellas se adquieren, en forma sistemática, los conocimientos necesarios para brindar confiabilidad en los estudios que cotidianamente se realizan en los laboratorios de esta especialidad. Al respecto, cabe mencionar que apenas en octubre pasado tuvimos la oportunidad de disfrutar las actividades académicas, culturales y sociales que nos brindaron el XXI Congreso Latinoamericano de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio y el XLII Congreso Mexicano de Patología Clínica, celebrados en Cancún. Ya tenemos en puerta otra gran oportunidad de actualizar nuestros conocimientos en la especialidad, de disfrutar de la belleza natural de Mérida, Yucatán, y sus alrededores, pero sobre todo, de volver a convivir y compartir conocimientos y experiencias académicas con los amigos y colegas de las diversas entidades nacionales e internacionales.

Para tal propósito, el Comité Organizador del XLIII Congreso Nacional Mexicano de Patología Clínica, a cargo de la Asociación Mexicana de Patología Clínica, se ha esmerado en la programación de eventos científicos y socioculturales de la más alta calidad para la plena satisfacción de los asistentes. Se contará con la participación de especialistas expertos, nacionales y extranjeros; tienen hecha la invitación a investigadores Premios Nobel, de los cuales se espera su aceptación y participación académica. Habrá que reservar estas fechas, fin de octubre e inicio de noviembre del presente año, para asistir, participar y disfrutar de lo que será un gran Congreso.

Cabe mencionar que, a través de las gestiones encabezadas por nuestro colega y amigo el doctor Roberto Ruiz Arenas, se logró obtener para México la sede del Congreso Mundial de Patología Clínica y Anatómica que se celebrará en 2015 en Cancún. Seguramente que con el esfuerzo conjunto del Comité Organizador, de la Federación Mexicana de Patología Clínica y las asociaciones, sociedades y colegios que la integran, se ofrecerá un Congreso que además de cubrir las expectativas de nacionales y extranjeros, responda a la confianza que nos ha depositado la WASPaLM y se ponga en alto el nombre y prestigio de la Patología Clínica de México.

New observations on the ecology and epidemiology of *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis

2. Ecological niches of *S. schenckii* and zoonotic outbreaks

Key words: *Sporothrix schenckii*, sporotrichosis, ecology, epidemiology, zoonotic disease, HIV infection.

Palabras clave: *Sporothrix schenckii*, esporotricosis, ecología, epidemiología, enfermedad zoonótica, infección por VIH.

Recibido: 23/09/2012
Aceptado: 16/11/2012

Este artículo puede ser consultado en versión completa en:
www.medigraphic.com/patologiaclinica

Teodoro Carrada-Bravo,*
Miguel Iván Olvera-Macías*

* Sporotrichosis Research Unit, Tropical Medicine Research Centre.

Correspondencia:
Teodoro Carrada-Bravo, M.D.
Calzada de los Rincones 694,
Col. Las Plazas, 36620,
Irapuato, Guanajuato, México.
E-mail: drcarradabravo@hotmail.com

Color images available at: www.medigraphic.com/patologiaclinica
Imágenes a color disponibles en: www.medigraphic.com/patologiaclinica

Abstract

Sporotrichosis is the most common subcutaneous mycosis in the Americas, Japan, India and South Africa. Classically, infection was associated with out-of-door occupations and the traumatic inoculation of soil, vegetables, thorns, straws and grasses, contaminated with *S. schenckii*. This paper presents the fungus ecology and disease risk-factors, according to recent epidemiologic and laboratory research work. From 2005 through 2008, 804 human new cases were diagnosed at the Evandro Chagas Clinical Research Institute (IPEC), most affected were women 40-49 years, engaged in domestic duties and from deprived social strata. Close contact with cats was recorded in 91% of human cases, bites or scratches were reported by 68% of patients. Also 64 dogs and 1,503 infected cats were confirmed at IPEC. Canine sporotrichosis presented as self limited mycosis. Feline disease varied from subclinical infection to systemic disease with hematogenous dissemination of *S. schenckii*. The cat's zoonotic potential was demonstrated by isolation of *S. schenckii* from skin lesions biopsy, and the ma-

Resumen

La esporotricosis es la micosis subcutánea más prevalente en las Américas, Japón, India y Sudáfrica. Clásicamente, la infección se asociaba con la inoculación traumática del suelo, vegetales, espinas, paja o zacates contaminados con *S. schenckii*. Esta publicación presenta la ecología del microorganismo y los factores de riesgo de la enfermedad, según los trabajos de investigación más recientes, referentes a la epidemiología y laboratorio. Del 2005 al 2008, se diagnosticaron 804 casos nuevos en el Instituto de Investigación Evandro Chagas (IPEC) en Río de Janeiro, Brasil. Las más atacadas fueron las mujeres de 40-49 años de edad, amas de casa procedentes de los estratos sociales más pobres. El contacto directo con los gatos se reportó en 91% de los casos humanos, el antecedente de mordeduras y arañazos fue recabado en 68% de los afectados. Además, en el IPEC se confirmaron más de 1,503 gatos y 64 perros infectados. La esporotricosis canina se comportó como enfermedad autolimitada. La enfermedad gatuna varió desde una infec-

terials collected from oral-nasal cavities, and nails. From 1999 through 2009, there were 21 HIV patients with sporotrichosis the largest case series reported to date. Eleven (52.4%) were treated with oral itraconazole and eight (38.1%) amphotericin-B, with an overall excellent cure rate of 81%.

Definition

Sporotrichosis is a chronic infection usually limited to cutaneous and subcutaneous tissues; it involves all layers of skin and the subcutaneous lymphatics.¹ The disease is caused by different species of the dimorphic fungus *Sporothrix schenckii*.^{2,3} The fungus is present in the environment in soil, plants and animals, it invades through skin injury. Many times, injury is so minor that it goes unrecognized and neglected.⁴ The fungus produces indolent lesion which appears as small erythematous nodule or verrucous plaque, and may remain localized (fixed type), or spread centrally through the lymphatic draining the area, establishing a chain of granulomatous, ulcerating nodules (lymphocutaneous type). Sporotrichosis generally affects the exposed parts of the body, namely, the hands, arms, face and legs.^{5,6} Pulmonary sporotrichosis results from inhalation of the fungal spores, and occurs in humans with a variety of underlying conditions such as sarcoidosis, malignant neoplasm, diabetes mellitus, and chronic alcoholism.⁵ Infection may disseminate to become generalized involving skin, bones, joints, bursa and the central nervous system. Patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), or immunosuppressant, are at greater risk of multifocal, hematogenous spread and disseminated fatal infection.⁶

Extracutaneous sporotrichosis shows marked male predominance 6:1 in widely scattered areas, most affected were males 24-50 years of age.^{7,8}

ción subclínica, hasta la forma sistémica con diseminación hematológica de *S. schenckii*. El potencial zoonótico de los felinos se demostró por el aislamiento de *S. schenckii* a partir de las biopsias de piel y de las cavidades oronasal y de las uñas. De 1999 a 2009, hubo 21 enfermos VIH-positivos con esporotricosis, la serie más grande reportada hasta esta fecha. Once (52.4%) fueron tratados con itraconazol oral y ocho (38.1%) recibieron amfotericina B, con una tasa de curación excelente de 81%.

The new taxonomy and mycology

Sporothrix schenckii an eukaryotic organism, has chitin on its cell wall.³ For several year it was classified as *Deuteromycotina*, however, recent research imply it is an ascomycete (*Ascomycota*, class *Pyrenomyces*, order *Ophiotomatales*, family *Ophiostomataceae*), since it has simple septum with Woronin bodies, and three chitin synthasa genes,⁹ the fungus produces dematiaceous (melanin +) conidia,¹⁰ and does not produce perithecium on malt, rice or potato media. The sexual form of *S. schenckii* is as yet unknown.³

S. schenckii is one of several fungal pathogens that exhibit temperature dimorphism,^{1,7} In the environment or the laboratory, on standard culture media such as Mycosel-cycloheximide or Saboureaud-dextrose-agar at 25°C, after four days it forms moist, white to cream colored colonies, shiny at first and later become fuzzy. In time, the colony is membranous, brown to black and mycelial (M) (*figure 1*). Some primary isolates have the ability to form dark colonies from the beginning of growth (*figure 2*).

At room temperature the fungus has thin septate and branching hyphae 1 to 2 μ m in diameter. Microscopic observation of M-saprophytic stage shows thin walled hyaline conidia, however, the presence of dark brown thick walled solitary conidia, tear or globose shaped, arranged in sleeves around the main hyphal axis, and the oval borne sympodially on a lateral conidiophores (*figure 3*), their shape suggest a palm tree or flower head^{1,2}

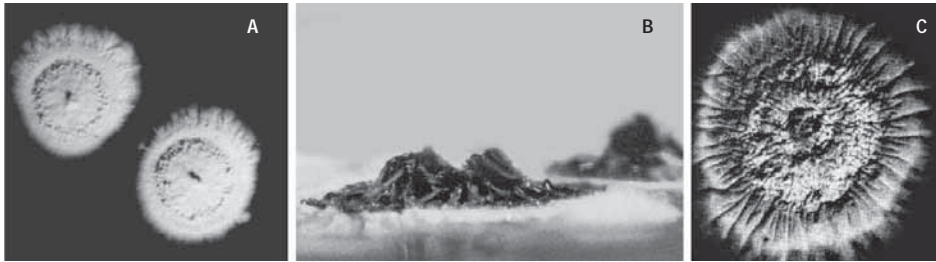


Figure 1. Colonial Morphology. **A:** Two white colonies, initial isolate from a case of articular disease. **B:** Colonial side view of a «volcano on an island». **C:** After two weeks, folded, black-brown with radial grooves (Courtesy Dr. J. W. Rippon).

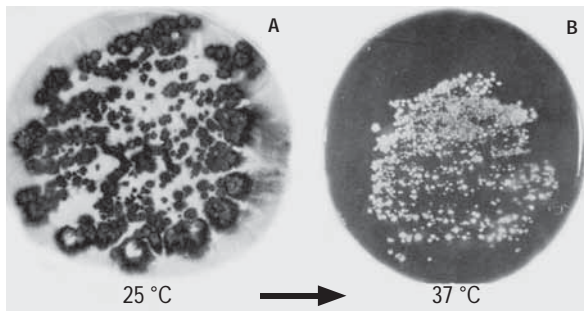


Figure 2. A: Primary isolates from cavitary pulmonary disease, black and wrinkled folded colonies (25 °C). **B:** Transferred to BHI-agar at 37 °C, glistening, white, soft Yeast-colonies (Courtesy Dr. J. W. Rippon).

(figure 4). M-stage grows well on pH around 3.0 to 11.5 and can withstand Na Cl 7%.^{10,11}

The yeast (Y) stage can be produced *in vitro* by culturing mycelia or conidia in rich medium such as brain-heart-infusion agar (BHI) at 37 °C. The Y-colony is pasty, glabrous, dull white, or tan, soft and bacteria-like with a wrinkled surface. The yeast cells generated *in vitro* are oval, sub globose or cigar-shaped with one or several buds. In the hamster and human tissues, Y-cells are surrounded

by radiated eosinophilic substance, with covering of approximately 10 $\mu\mu$ in thickness called asteroid bodies^{1,6} (figure 5).

The dimorphic M-Y transformation involves calcium/calmodulin-dependent protein-kinases and, signaling interaction between cytosolic phospholipase and protein G.^{12,13} Y-cells grow well within pH range 3.0-8.5, and NaCl 11%.¹¹ When yeasts are cultured in albumin-containing medium, two extracellular proteinases are produced: 1) chymotrypsin-like, molecular weight (mw) of 36, 500, optimal pH 6.0, and 2) cathepsin-D-like, mw 39 000, optimal pH 3.5 these two enzymes may be related to the virulence of the fungus since they hydrolyse substrates such as stratum corneum, collagen I, and elastin.¹⁴ All strains are able to split urea, and can tolerate cycloheximide at 0.25%, thiamine is required for good fungal growth.¹⁻³

Laboratory animals such as mice, rats, guinea pigs and hamsters are susceptible to sporotrichosis.⁷ When a conidial suspension is injected intraperitoneally into male mice, orchitis is recorded within 10 days to two weeks. Testes with lower

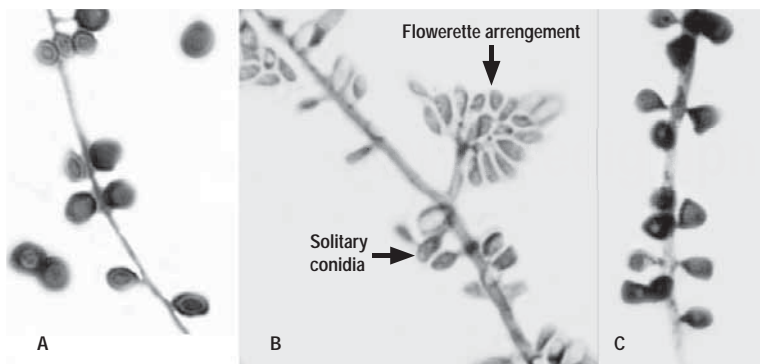


Figure 3. Mycelial microscopic morphology. **A:** Globose dark conidia, on side of a hypha x 1,080. **B:** Elliptical to oblong hyaline and pigmented, dense conidia along the hypha axis x 1,417. **C:** Triangular deeply pigmented macro conidia. They appear to be more resistant to drying and UV-light, and are also more virulent for mice x 2,060 (Courtesy of Dr. F. Mariat).

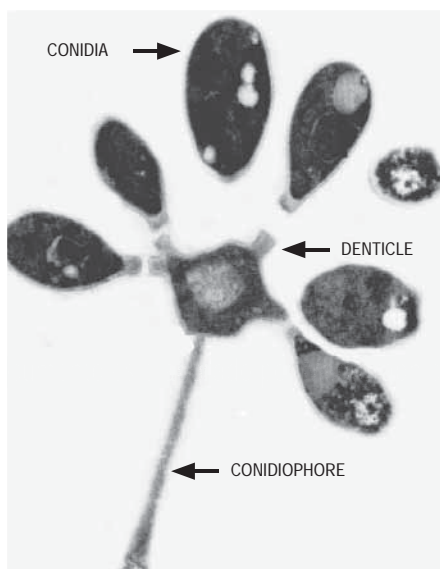


Figure 4. Electron micrograph of *S. schenckii*, flower-like arrangement (sympodially), on swollen tip of slender and taper conidiophore with denticles, and six oval conidia x 10,000 (Courtesy Dr. H. D. Raj).

and tail may be observed. Congenitally athymic (nu/nu) mice are found to be far more susceptible to iv-challenge than their phenotypic ally normal littermates, suggesting T-lymphocytes are critical to host resistance.⁷

Molecular techniques have been used to asses genetic variability of the complex-species *S. schenckii*, however, only few were found to be useful in clinical research. Restriction-fragment-length-polymorphism (RFLP) of mitochondrial-DNA. (mt-DNA), and calmodulin gene sequencing are powerful tools for epidemiological analysis and intra-specific typing-clustering of new environmental and clinical isolates.^{1,3,6}

Ecology of *S. schenckii*

Open bogs are a feature of glaciated landscapes, they provide a vital wetland (92% of water), for *Sphagnum* moss (sm), a little plant that do not produce flowers or seeds, but can grow from fruiting bodies (capsules), full of spores. When the mosses dies, they do not rot away because the bog ground is acidic pH 3-4, and waterlogged with very little oxygen, the chemical composition is low in organic nutrients and higher amounts of ammonium 73ppm and nitrate 13.8ppm, therefore, bacteria and fungi that normally break down plant materials, cannot survive inside the anaerobic bog. Dead mosses

8

temperature, support growth of the fungus faster than internal organs. Higher thermo tolerance isolates (37°C) multiply in the internal organs, but grow faster in the testes. Lower thermo tolerance isolates 35 °C; multiply well in testes but not in the internal organs. Intravenous injection (iv) of at least 10⁵ to 10⁶ cells of clinical isolate are necessary to produce disseminated and lethal disease. With a lower dose, osteoarticular infection of the paws

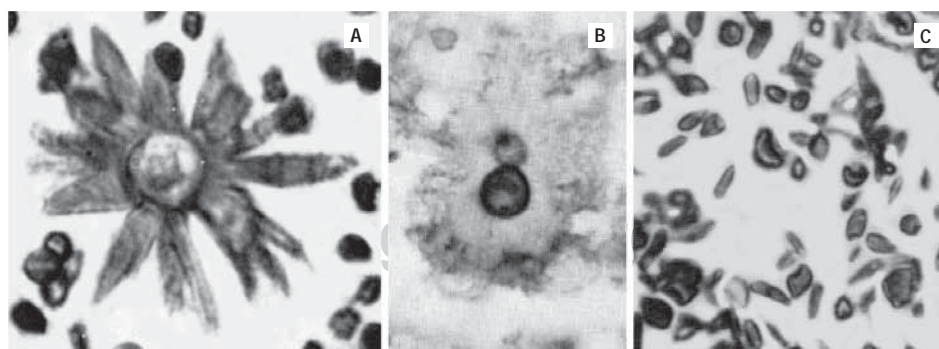


Figure 5. Yeast morphology. **A:** Asteroid body stained with H&E x 1,350. **B:** Asteroid body, the yeast was stained with PAS method x 1,125. **C:** Numerous oval-to-cigar shaped cells from guinea pig testes. Grocott-silver-methenamina x 1,200 (Courtesy Dr. Pedro Lavalle).

remains pile up and get pressed together, so it can take from 7,000 to 10,000 years to produce giant bogs 7-10 meters ticks, such as those found at Wisconsin, USA and Southern Canada.

Sphagnum plants grow closely packed together with others of the same kind, providing support for each other's tiny stems (figure 6). Sm acts like as sponge wet for long time, it can soak-up more than

eight times its own weight in water. They also have high zinc content in the form of a naturally occurring antibiotic called tropolene. The anaerobic bacteria causing wood decay are nullified by antiseptic properties of *Sphagnum*. Hence, it usually serves as an ideal medium for re-invigorating the weak seedlings, and root-rot trees. Long fibered dried sm also has excellent water retention properties, and



Figure 6. A: Live *Sphagnum* moss on the surface of a bog, at Wisconsin, USA. B: Dried, long fibers of *Sphagnum* are used by its water-retention and antiseptic properties. C: A turtle-shaped topiary, supported on a metallic structure, and filled with sm.



Figure 7. A: Orchids, growing on wetted sm. B: *Sphagnum* moss mixed with soil are widely used by gardeners and C: Carnivorous plants and sm mixture.



Figure 8. A: A garden-basket was filled with wetted moss to grow ornamental plants. B: The moss can be changed by coconut husk fibers, to reduce the risk of sporotrichosis.

is able to keep an open, well aerated structured: perfect for growing bonsai, orchids and carnivorous plants (*figure 7*). A small amount of sm can be added to inorganic soil mixes, such as akadama and grit, to provide a stable organic ingredient and, to add color to the foliage of coniferous species such as Junipers and Pines. The lining of hanging garden-baskets are made up of sm, also used to make wreaths and to produce artistic topiaries. Thus, there is a definite potential for infection with *S. schenckii* in those who work with wetted sm, and do not wear protective globes. The fungus mass seems to increase in the moistness of most packing sheds.¹⁻⁵ Population of *S. schenckii* increases on dead but not on living *Sphagnum* moss. Experimental and clinical epidemiologic observations support the contention that at some point during or after harvesting, the moss is contaminated with the pathogen, which then colonizes and reproduces on the dead plant, under favorable conditions (warm and moist).¹⁻⁵ Nursery-workers have changed the traditional use of wetted moss, by the coconuts fibers (*figure 8*), to reduce risk of fungal infection.

The environmental niches in which the fungus grows most luxuriantly include: decaying vegetation, potting and garden soil, prairie hay and grasses. Persons exposed to these materials have a risk for developing sporotrichosis.¹⁻⁵ Thus, most clinical cases occur in healthy young man, whose occupation or hobby takes him into the out-of-doors.¹⁻⁵ Classically, farmers, nursery workers, gardeners, landscapers and laboratory workers develop cutaneous sporotrichosis because they are exposed to contaminated materials, and their daily activities frequently lead to nicks and cuts on their extremities and face (children), allowing the fungus easy access.⁵

In children under 10 years insect stings, animal bites, falls and abrasions are mainly responsible; while in the group 11-20 years sporting activities such as foot-ball, rugby and cricket, contributed.¹⁵ Over the age 21, some occupational activities have been associated with sporotrichosis. Classically,

rose gardeners and farmers, develops cutaneous sporotrichosis. Other specific occupations linked with sporotrichosis: forestry workers, packing and handling pine seedling in sm, artistic topiary production, masonry work, gold mining, hay baling, packing pottery with grass, and Christmas tree farming.¹⁶⁻¹⁸ Motor vehicle accident, hammer blows, injury by metal knives or particles, handling of fish spines and other traumas may lead to inoculation of soil into skin tissues.^{5,7} Zoonotic transmission of *S. schenckii* is from bites or scratches of animals, most commonly reported are cats and armadillos,^{19,20} in the cases of South America armadillos, the mammal is not infected but, while trying to escape capture, inflict scratches and thereby inoculates *S. schenckii*.²⁰ Cats develop disseminated skin ulcers, with often fatal infection.^{1,19} The fungus is spread from ulcer or from bites and scratches to cohabitant humans.¹⁻⁵ and dogs.

Several cases of sporotrichosis have been described among laboratory workers who handled animals infected with or cultures of *S. schenckii*. Generally, cutaneous inoculation has occurred, but ocular involvement subsequent to a splash of culture material into the eye has also been described.²¹ Primary infection potentiating mechanism include: higher number of virulent-pigmented fungal conidia inoculated in association with abrasives, so that minor skin trauma can easily occur, and the opportunity for sustained exposures.²²

S. schenckii seems to thrive well in potting soils, Kenyon et al isolated the fungus from two of 12 samples,²³ and the presence of melanin in the cell wall of the organism is thought to confer a selective advantage, allowing the fungus to survive desiccation and ultraviolet (UV)²⁴ irradiation, and conidia may remain viable for several years.²⁴ The fungus grows in soils plentiful of cellulose, pH range 3.5 to 9.4 and mean temperature 31 °C, but relative humidity cannot be below 92%. *Sporothrix* sp, has also been isolated from diverse sources: the floor of a swimming pool (Staib 1983),²⁵ from desiccated

mushrooms (Kazanas, 1987),²⁶ and from fleas, ants and horse hair.¹⁵ *S. schenckii* has the ability to grow in fabrics such as flannel, hessian, coarse felt and white canvas (Du Toit, 1942).²⁷ Further research is needed to establish the possible role of diverse environmental sources in the spread of the disease.¹⁻¹⁵

Environmental sampling to isolate *S. schenckii*

The laboratory of Medical Microbiology receives samples such as packed *Sphagnum* moss, evergreen seedlings, soil and water.¹⁰ The purpose of environmental sampling is to determine the source of *S. schenckii* and to know the point at which the moss was contaminated with the fungus.^{1,4}

A) Direct plating technique: the sample is first exposed to par dichlorobenzene crystals, in a closed clean container for 24 hr, to control mites. In the Mycology Laboratory it is usually processed by an aqueous extraction method. After placing 25 ml loose sample volume in flasks, adding penicillin and streptomycin in water to reduce bacterial contamination, preparing the suspension, and making dilutions for agar plating 0.2ml/plate on Mycosel-cycloheximide-agar, followed by daily examination of white, light brown or black colonies. Selected isolates are deposited in a sterile water culture collection and, stored at room temperature. Macroscopic colonial morphology was evaluated after seven days, on potato dextrose-agar (PDA), cornmeal-agar supplemented with tween-80 at 1%, and Saboureaud-dextrose-agar (SDA) incubated at 27 °C. Microscopic morphology was evaluated with PDA-slide-culture, incubated at 30 °C for 14 days.^{1,4} Isolates producing one celled conidia sympodially on lateral, erected conidiophores were given preliminary identification of *Sporothrix sp.* whit emphasis on the presence of oval, melanin (+) conidia, arranged in cylindrical sleeves around the hyphal axis.¹⁰

B) Virulence has been defined as the relative ability of a microbe to cause damage in the host⁶ or to produce disseminated life-threatening infec-

tions, following iv-injection of > 10⁶ conidia/mouse. A laboratory model has been proposed: Male mice were inoculated iv by injection of 5x10⁶ to 2x10⁸ conidia /mouse. Virulent (vi) fungal strains, grew exponentially in livers and testes throughout a 14 days period, with a 100% mortality between 12 to 24 days, after injection. These vi isolates grew at 37 °C, and were melanized in PDA-media. Some few dematiaceous strains grew at 35 °C, but not a 37 °C, and were mice-avirulent. Remaining strains were not melanized and avirulent, finally identified as *Ophistoma stenoceras* and *Sporothrix sp.*^{10,28}

A complete understanding of an infectious disease requires knowledge of the geographic distribution of the causal fungus, in diverse environments.^{1,15} Specific research of the natural sources of the organism is important in establishing the mode of infection, and demographic characteristics such as age, sex, occupation, socioeconomic status and to measure the occurrence of disease by time, place and persons, to determine whether there has been an increase or decrease of sporotrichosis new cases over the years; whether one geographical area has a higher frequency of sporotrichosis than another; and whether the characteristics of infected persons distinguish them from those without it.²⁹ Numerous interesting reports are available on the ecology-epidemiology of this pathogenic fungus (Findlay, Vismer et al.);^{15,30,31} (Howard and Orr et al.);³² (Mackinnon, Conti-Diaz, Gezuele E et al.);^{33,34} Shippee JK;³⁵ Fukushiro R;³⁶ (Gosh, Chakrabarti et al.);³⁷ (Dixon, Salkin, Cooper, Bruce-Coles).^{10,16,21,28}

Rio de Janeiro, outbreak of epidemic zoonotic sporotrichosis

In Latin-America, sporotrichosis is the most common subcutaneous mycoses.³⁸ Classic descriptions were associated with traumatic inoculation of soil, splinters and organic matter contaminated with *S. schenckii*.^{1,6,39} An increasing number of human sporotrichosis cases have been reported in Rio de

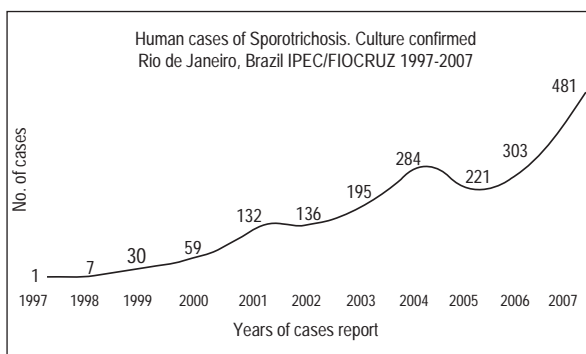


Figure 9. Annual cumulative number of human sporotrichosis cases, confirmed at the Evandro Chagas Clinical Research Institute, Rio de Janeiro, Brazil. (Courtesy of IPEC/Fiocruz).

Janeiro, Brazil, associated with contacts of cats, affected by the same fungal disease.^{39,40} From 1998-2004, there were 759 humans and 1,503 cats, diagnosed by culture-isolation of *S. schenckii*, in the laboratory specimens submitted at the Evandro Chagas Clinical Research Institute, Oswaldo Cruz Foundation (IPEC/Fiocruz).³⁹ This represents an epidemic increment vis-à-vis previous recorded case, because during the previous 12 years, there were only 13 cases diagnosed at the IPEC/Fiocruz.⁴⁰

From 2005-2008, 804 human patients with sporotrichosis were recorded, an annual increase of 85% (figure 9). The clinical-type diagnosis^{1,3} was: lymphocutaneous form 66%, fixed cutaneous 25% and disseminated 9%, (multiple cutaneous with or without extracutaneous lesions). The most attacked population segment were housewives taking care of cats, aged 40-49 years, who came from deprived and poorer social-strata.⁴¹ As a rule, feline disease preceded human and canine disease, domiciliary or professional contact with sick or asymptomatic cat was reported in 91% of human cases. Bites and or/scratches were reported by 68% of these patients, suggesting such lesions as the putative mean of fungus-transmission.³⁹⁻⁴¹ (figure 10). Repeated isolation of *S. schenckii* from nails and oral cavities of cats reinforces evidence indicating traumatic-skin primary infection, whereas isolation from nasal fossae and ulcerated cutaneous

lesions, together with the plethora of yeast-like cells observed in histological sections of skin biopsies, demonstrates the factibility of contamination through secretions. The results of molecular typing of *S. schenckii* isolated from humans and animals support this hypothesis.^{1-10,39-41}

The treatment of choice was oral itraconazole 514 (64%), and terbinafina 184 (23%). Amphotericin-B was used only in six patients. Almost 2% of clinically cured patients had relapses, whereas 90 (11%) did not needed therapy, because of spontaneous cure. Post treatment follow-up was from 3-6 months: Nine patients were lost, and six were hospitalized, with two deaths. Irrespective of the drug regimen, the cure-rate was 89%.⁴¹

Domestic felines langer epizootic in Brazil

Medical records of 374 infected cats with *S. schenckii* infection were evaluated. Of these, 151 (43.5%) were from Rio de Janeiro and 196 (56.5%) from neighboring municipalities. Cats came from 225 different houses, the number of infected cats per house ranged from 1 (n 173=76.9%) to 22 (n 1=0.4%). Of male sex were 228 (65.7%) and sexually intact 186 (53.6%). The cats habits of digging holes and covering their excrements with soil and sand, and sharpening its nails on trees, woods or trunks, are probably responsible for the carriage of the fungus on its nails and claws, even as a healthy carriers (figure 11). Intact male cats frequently have fights and territorial disputes with other cats and dogs (figure 12). Souza and Meirelles were able to isolate *S. schenckii* from the claws of 16.5% of examined cats, in Rio Grande do Sul, Brazil (Souza LL, Meirelles MCA. (*Sporothrix schenckii*: estudo epidemiológico em populações de gatos, Universidade de São Paulo, Brasil, 2001; p 146). The large number of dogs infected with sporotrichosis in Rio de Janeiro, may be attributed to cats bites, scratches and purulent secretions as the main sources of fungal infections.

The known common route of infection was: fights with other cats 127 (71.0%); contact with sick cats 40 (22.3%); iatrogenic 10 (5.6%), others 2 (1.1%). The mean duration of skin lesions varied from one to 128 weeks (median, eight

weeks). Lymphangitis and regional lymphadenitis were observed in 92 (26.5%), however, the most frequently recorded lesions were extensive and exudative, multiple ulcers, with zones of necrosis (figure 13). Most cutaneous lesions were localized



Figure 10. Domestic cats infected by *S. brasiliensis* and *S. schenckii* generated the simultaneous epidemic epizootic increases: Feline disease was transmitted through the bites, scratches or purulent secretions, as a means of fungus contamination to humans and dogs.



Figure 11. A: Domestic cats roaming out-of-doors may be infected by repeated contacts with soils, wood, rodents and grasses of the environment. **B:** Intact young male cats have frequent fights and territorial disputes with other cats; these provide new chances of epizootic fungal transmission of virulent *S. brasiliensis* strains, confirmed by isolations from cat's nails and oral cavity.



Figure 12. Domestic cats are the main carriers of virulent *S. brasiliensis* strains, feline epizootic disease preceded canine-sporotrichosis cases, and domiciliary contact with sick cats was recorded in 84% of the infected dogs.

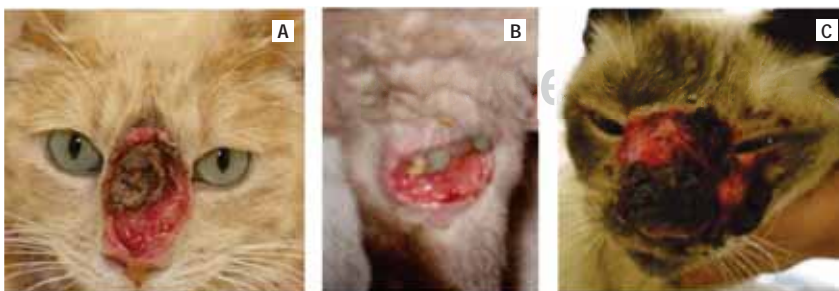


Figure 13. Sick domestic cats with sporotrichosis, frequently had multiple lesions. **A:** On the dorsum of nose, **B:** and **C:** Extensive, widespread, exudative ulcers with necrosis, on the head, cheeks, nose, ears and hind limbs, with a high burden of infectious yeast-cells.

EPIDEMIC-ZOONOTIC SPOROTRICHOSIS. CULTURE CONFIRMED CASES, RIO DE JANEIRO, BRAZIL. 1987-2007

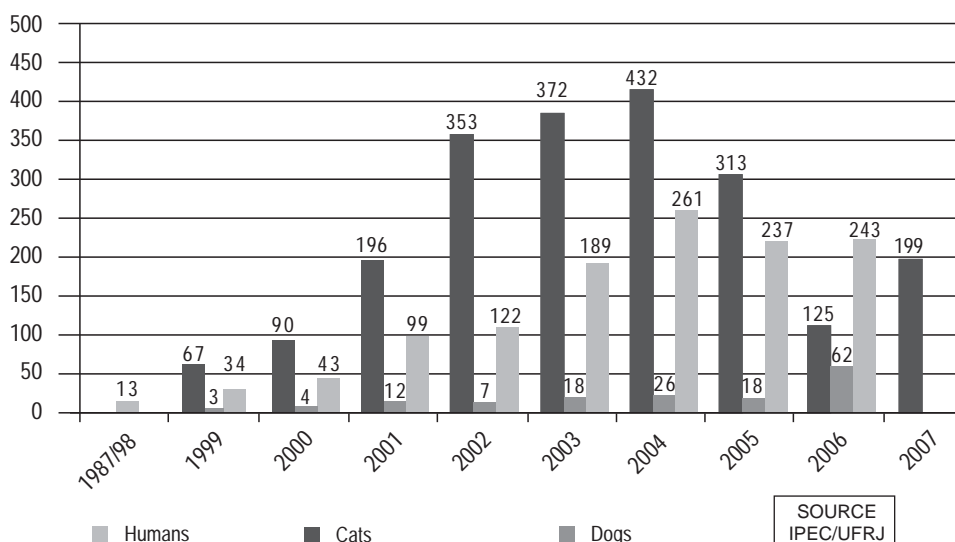


Figure 14. After 1997, the Rio de Janeiro «favelas» in the low-income quarters of the suburbs, suffered the ongoing human epidemic of sporotrichosis, with simultaneous increases of domestic cats and dogs infected by virulent strains of *S. brasiliensis* and *S. schenckii*, as common sources of the outbreak.

14

on the head (56.8%), especially the nose (27.9%), ears (21.6%), and hind-limbs (13.8%). Nasal, oral or genital mucosal involvement was recorded in 34.9%. According to number of lesions (L): Absence of skin lesion L/0=10 (2.9%); skin lesion on one anatomic site L/1=114= 32.8%; on two anatomic sites 86 (24.8%); and >L/3=137 (39.5%). The statistical difference between >L/3 and other groups was significant ($P<0.001$). L3 was associated with lesions on the nose and nasal mucosa ($P<0.001$).

General bad condition of the cat was observed in 108 (31.1%), and respiratory signs in 154 (44.4%). Histopathology examination of 90 cat's biopsies showed a widely distributed dermal inflammatory infiltrate of mononuclear cells and polymorph nuclear neutrophils. Granuloma formation was confirmed only in 11 (12.2%) biopsy specimens, extracellular yeast-like elements in 56 (62.2%), but not «asteroid-bodies» were seen. There was inverse correlation between presence of granuloma and histopathology finding of *S. schenckii*-yeasts. Anemia, leukocytosis with neutrophilia, hypoalbuminemia and hyperglobulinemia were the main hematologic abnormalities,

but anemia ($P<0.07$), neutrophilia ($P<0.01$) and hypoalbuminaemia ($P<0.001$), predominated in group L/3, as compared to the L/1 and L/2 groups. There were no significant clinical or laboratory differences in the cats with or without feline immunodeficiency virus or feline leukemia virus, tested in 142 animals. During the study 118 (34.0%) cats were lost and 124 (35.7%) died. Only 266 were treated and 68 (25.6%) were cured, complete healing was reported regardless the presence of respiratory signs, general condition status or drug treatment schedule applied.⁴² Human epidemic disease raised-up in parallel with cats and dogs epizootic sporotrichosis (figure 14).

Canine sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil

Sporotrichosis was considered to be rare in dogs, usually acquired after hunting activities, with possible traumatic inoculation of the fungus through thorns and wood splinters. Canine disease was characterized by fixed skin lesions on the head, ears and thorax, very few cases of disseminated and

osteoarticular form have been published, the largest series of canine cases consisted of only 12 dogs (Freitas D et al. *Rev Fac Med Vet Sao Paulo*. 1965; 7: 381-387), and (Londero AT et al. *Sabouraudia* 1964; 3: 273-274).

In a five years period from July-1998 to October 2003, sporotrichosis was diagnosed in 44 dogs at the Zoonotic Service of IPEC/Fiocruz; 23 (52.3%) were males and 21 (47.7%) females, including one pregnant. Age varied from six months to 12 years (median = 4 years); 23 (52.3%) were mongrels, 14 (31.8%). Toy miniature-breeds, seven (15.9%) other breeds. Thirty-seven (84.1%) had contact with sporotrichosis confirmed cats, that inhabited the same household environment. Previous unrelated traumatic injury only two (4.5%).

Skin ulcers, fixed plaques or nodules were namely observed (*figures 15 and 16*). The known duration of dermatosis ranged 2 to 48 weeks, median = 6 wks. Subcutaneous nodules softened slowly, draining sera purulent material and progressing to an exudative ulcer, with elevated borders and granulomatous funds. Accordingly to number of lesions (L): Solitary L/1 = 18 (40.9%); L/2-4 = 17 (38.6%); L/5 or more = 9 (20.5%). L-Topography: on nose 25 (56.8%); forelimbs 13 (29.5%), nasal mucosa involvement 9 (20.5%), and with lymphangitis-lymphadenitis were 22 (50%).

Mycological diagnosis was confirmed as follows: a) Direct microscopy of secretions 6 (13.6%); b) *S. schenckii* was isolated by culture of exudates in 25 out of 33 specimens (75.8%). Higher number of isolates were recorded by culture of tissue-fragment 41/42 = 97.6% of samples. Swabs from nasal lesions 7/12 (58.3%). Histopathology examination of skin biopsy tissue showed: an inflammatory chronic process and granuloma formation in 19 (45.2%), yeast-like cells were visualized 7 (16.7%), and no asteroid bodies were observed.

Most common hematologic abnormalities were anemia, eosinophilia, neutrophilia and lymphopenia. In 34 dogs, biochemical serum-examination was performed: High concentration of serum-proteins

in 11 (32.4%) within ranges 5.4-7.1 g/dl; hypoalbuminemia <2.6 g/dl in 21 (61.8%) and hyperglobulinemia >4.4 g/dl in 18 (52.9%).

During the study period-time eight dogs were lost to follow-up, three were euthanized upon owner's request, five (15.2%) had spontaneous regression of lesions, and 28 (84.8%) were cured after treatment with itraconazole-ketoconazole, duration of chemotherapy ranged from 2 to 5 months (median=2.5 months). Adverse drug effects were recorded in 3 animals: anorexia, vomiting, diarrhea and elevation of the hepatic enzymes levels. Dogs with culture confirmed sporotrichosis, responded well to chemotherapy and skin lesions frequently were self-limited.⁴³

Sporotrichosis in HIV-infected patients, Rio de Janeiro, Brazil

In the medical literature only 34 isolated cases of sporotrichosis associated with human immune deficiency virus (HIV) infection, have been described since beginning of AIDS-epidemic through 2009, namely, and with disseminated cutaneous, osteoarticular, central nervous system (CNS), pulmonary and ocular lesions (*figure 17*). (Gutierrez-Galhardo MC et al, 2010). In Brazil, in the period 1980-2008, a total of 506, 499 AIDS-cases were diagnosed, 60% from the Southeast Region, and Rio de Janeiro is the Brazilian State with second largest number of AIDS-cases (Ministry of Health, Epidemiologic Bulletin, May 19th, 2010).

From February 1999 to December 2009, the Dermatology and Infectious Disease Team at IPEC/Fiocruz, reported 21 clinical cases of sporotrichosis in HIV-infected patients, an increase of 126%: this sample represents 1.2% of human sporotrichosis seen at IPEC from 1999-2009. 16 (76.2%) were men and five (23.8%) women, the mean CD4+ count was 346.4 cells/ul, and most cases gave an epidemiologic history of transmission from cats 66.7%. Mean duration of symptoms before clinical care was 5.75 months (range 0.5-6 months) how-



Figure 15. Dog's skin on the muzzle and nasal mucosa were confirmed as infected in 57% of the animals with sporotrichosis.

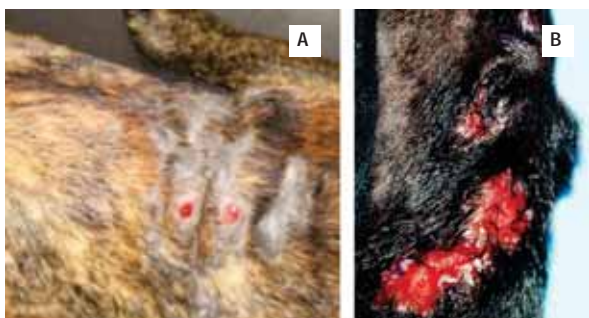


Figure 16. Dogs with fixed cutaneous sporotrichosis. **A:** Alopecic plaque with two subcutaneous ulcerated nodules of the cervical-dorsal area. **B:** Two open granulomatous ulcers of the left foreleg (Courtesy Dr. K Dantas-Filgueira, RF University of Mossoro, RN, Brazil).



Figure 18. A 24 years old gardener from Curitiba, Brazil. He presented with multiple ulcerated painful lesions, raised indurate margins and fetid secretions, distributed over the face, thorax, arms and legs. The CD4+ cells count 62/ μ l (Courtesy of Hospital of Clinics, UF Paraná, Curitiba, Brazil).



Figure 17. Cutaneous distribution of lesions in HIV-sporotrichosis disseminated cases, with multiple facial ulcers, also on the limbs, and lower abdomen.

ever, the HIV-positive patients without clinically defined-AIDS and no signs of immune deficiency, manifested as lymphocutaneous and fixed forms. By contrast, disseminated-widespread cutaneous lesions were observed in those with AIDS and CD4+ count <200 cells/ μ l, associated mucosal lesions and hematogenous propagation to bones and CNS. The skin was commonly affected 95.2%, and a rare case of destructive auricular chondritis, nodular cystic lesions and cervical lymphadenopathy. Cutaneous lesions manifested as ulcerated nodules 11 (52.4%), ulcers in eight (38.1%) and cystic masses one (4.8%). Ten (47.6%) patients reported prolonged fever for more than 1 month and seven (33.3%) with weight loss greater than 10 percent of body weight.

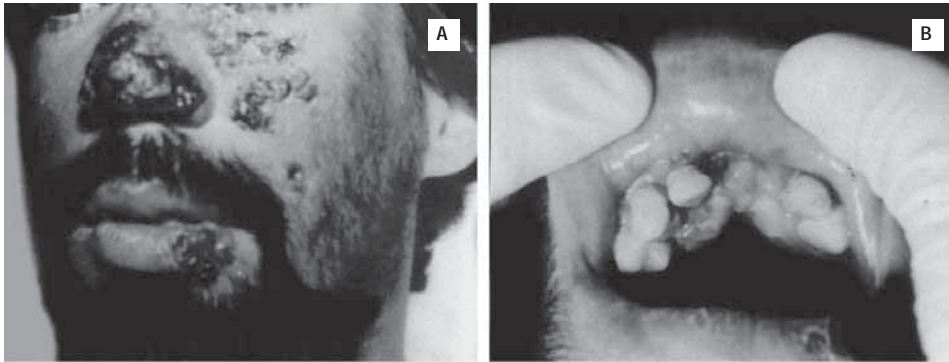


Figure 19. AIDS-sporotrichosis oral lesions. **A:** Ulcerated nodules on the face, lips, palate and nose. **B:** Hypertrophic infiltrated gingival.

Numbers and types of lesions (L) recorded: Twelve (57.1%) had up to ten-L; six (28.6%) had 11-20L; one (4.8%) with 51-L, and one 130-L. Extensive ulcerative L > 4 cm, were observed in eight (38.1%). Localized L were distributed on the upper limbs eight (38.1%) and one on abdomen (4.8%), the others had widespread disseminated skin-L (figure 18). Three patients had nasal inflammatory-L, including two with nasal septum destruction, and two with hypertrophic infiltration of the gingival with involvement of the palate and lips is Ls of the oral mucosa (figure 19).

Osteomyelitis was diagnosed only in two patients, a) localized on the ankle and knee, b) left index finger and tenosynovitis of left forearm. There were two cases with CNS-involvement. Four patients developed immune-reconstitution-syndrome (IRIS), 2-5 weeks after initiating antiretroviral therapy, with a significant increase of the CD4+ count and simultaneous viral load reduction-suppression. Two cases (9.5%) were observed with erythema multiform (a hypersensitivity reaction) which improved after combined treatment of prednisone-itraconazole. A rare case of granulomatous conjunctivitis was also described (figure 20), and a patient with bilateral auricular chondritis and lymphatic cervical cystic lesions (figure 21).

Mycologic diagnosis of sporotrichosis was based on microscopic observation of *S. schenckii* in the skin of 20 (95.2%), and the nasal mucosa in 2 (9.5%), cerebral-spinal fluid 2 (9.5%), and conjunc-

tiva mucosa, urine blood, and sputum collected one of each sample from four separate patients. Histopathology examination of 12 skin biopsy specimens showed: diffuse inflammatory dermal response, with mononuclear cells, neutrophils and some giant cells. Disseminated cases were characterized by the presence of numerous round, elongated, or cigar-shaped, elliptical yeast-cells, best visualized under PAS and silver staining-GG-methods (figure 22).

Eleven (52.4%) patients were treated with itraconazole, and eight (38.1%) also received iv-amphotericin-B, with an overall cure-rate 81%. Spontaneous cure was recorded in one (4.8%) patient. Sporotrichosis as opportunistic infection, must be considered in all countries where sporotrichosis and AIDS are both endemic.^{45,46}

Laboratory research was a powerful tool to establish the origin of the Rio de Janeiro zoonotic epidemic: *S. schenckii* was isolated from 100% of cat's cutaneous lesions; 66.2% of nasal cavities, 41.8% from the oral cavity and 39.5% of the nails. In addition, the fungus was cultured from the oral cavity of three clinically healthy cats. The presence of large numbers of intra-and extracellular yeast cells, and the absence of organized granulomas is characteristic of feline sporotrichosis.⁴⁷

Santos-Reis et al., used molecular-DNA-techniques, by typing 19 human and 25 animals *S. schenckii* isolates from the epidemic. By random amplified polymorphic DNA (RAPD), 5-10 genotypes were clustered, but the profiles of the



Figure 20. Right eye with erythematous and granulomatous conjunctivitis (Courtesy of IPEC/Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil).

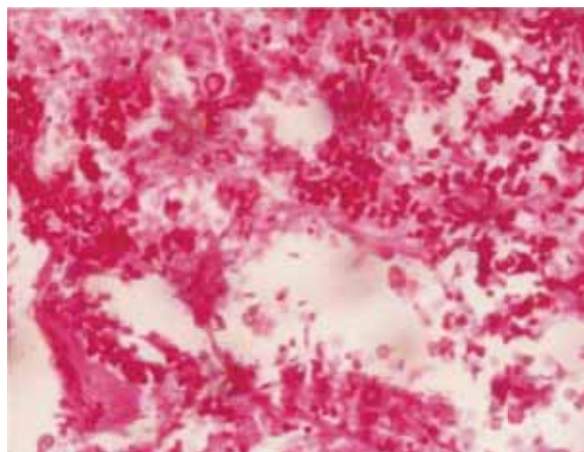


Figure 22. A skin-biopsy from AIDS-sporotrichosis case. Numerous oval and cigar-shaped yeast-cells of *S. schenckii* stained with a deep red color. PAS x 1,000 (Courtesy Hospital das Clínicas, UF Paraná, Curitiba, Brazil).



Figure 21. AIDS-patients with bilateral auricular lesions and destructive chondritis of the right ear. He also had nodular-cystic raised cervical lesions and neck lymphadenopathy (Courtesy of IPEC/Fiocruz).

Brazilian isolates could be distinguished from the control, United-States isolates. DNA-fingerprints of *S. schenckii* isolated from the nails (42.8%) and oral cavities (66%) of infected cats were identical to the human clinical human isolates, suggesting a common source epidemic source. Clearly, cats acted as link for the widespread dissemination of *S. schenckii*.⁴⁸

Phenotypic-molecular identification of 246 fungal isolates of patients attending IPEC/Fiocruz between 1998-2008 was as follows: 206 (83.4%)

were characterized as virulent *S. brasiliensis*; 15 (6%) *S. schenckii sensu stricto* and 1 (0.5%) as *S. mexicana*, and one single atypical strain of *S. globose* was identified (Mycopathologia 2011; 172: p 257).

Discussion

Several factors may explain the endemicity of sporotrichosis in developing countries: adults and children spend many hours of activities in the out-of-doors, being frequently exposed to punctures from thorns, splinters, and cuts from sedge barbs, handling of reed, *Sphagnum moss*, hay, and grasses.⁴³⁻⁵³ *S. schenckii* has been isolated from soil, humus, fertilizer, vegetables debris, moist wood, cat's nails and oral cavity and refrigerated meat. It has also been isolated from many types of plants, such as: horsetails, rose bushes, cacti, salt meadow hay, residual packing straw, carnations, wood splinters, gold mine timbers and most commonly from wetted *Sphagnum moss*.⁵⁴⁻⁵⁶ A practical preventive implication is: *Sphagnum moss*, hay and grasses, should be dried properly before packing, protected from wetting during storage, and not wetted any sooner than necessary prior to use.⁵⁷

Epidemiologic research is a powerful tool to evaluate the risk of infection.⁵⁸ In spring 1994, an outbreak of lymphocutaneous sporotrichosis (LC) occurred at a tree nursery in Florida, USA, 65 workers were involved in production of sm artistic topiaries (pto) which consist of shaping plants into ornamental forms, pto also involved handling of metal frames with chicken wires, and filling the artistic form with sm, and then planting small ivy plants into the wetted sm.

A case of sporotrichosis was defined as either a skin biopsy specimen or swab of a skin lesion, yielding *S. schenckii*. To determine risk factors, a questionnaire was administered to all nursery employees in pto, to collect demographic characteristics, various gardening activities and experience, local skin trauma and specific exposure to sm. Odds ratios (OR) and 95% confidence interval (CI) for univariate analysis were calculated. All variables statistically significant ($P < 0.05$), were included for multivariate logistic regression (SAS-software, version 6).⁵⁹

Among 65 workers nine cases of LC-sporotrichosis were identified, therefore: $9/65 \times 100 = 14\%$ attack rate, median age was 39 years (range 27-59), seven (78%) were male. Median time from observation of skin lesions until diagnosis was established was 17 days (range 1-38). Risk factors associated with sporotrichosis-disease were: A) spending > 20 h/week working with sm ($P < .01$) B) spending more time filling topiaries with sm, ($P = .05$); C) spending < 10 h in gardening work, per week ($P = .05$), which reflected less gardening experience. Wearing cotton gloves ($P < .05$) or rubber gloves ($P < .005$), were factors clearly protective. The nurseries purchased sm from local supplier in Florida, who received moss shipped from Wisconsin in plastic bales. The bale-moss was broken manually and soaked in water overnight. Wet moss was tightly packed inside chicken wires frames, the unprotected manipulation of metallic wires, resulted in minor injuries on hands and arms.^{59, 60}

A high index of early clinical suspicion and hospital quality surveillance, and prescription of appropriate therapy, remain most important for prevention. Primary health physicians should suspect sporotrichosis in any patient who presents ulcerative or verrucous plaque skin lesion, especially if there is evidence of lymphatic spread.^{60,61} Sporotrichosis is not a reportable disease in most countries, there is little accurate information on case-incidence, and known data are those generated by publications.^{1,3} Isolation of *S. schenckii* from skin lesions is the gold-standard of diagnosis.¹⁻⁵

Although information about the incidence of LC-sporotrichosis in the United States is limited, a few studies have estimated the annual incidence to be 0.2-2.4 cases per million persons, however; the large number of good publications reflects the research development in that country. Newton et al. after reporting a patient with LC-sporotrichosis from Laos,⁶² highlighted the difficulties in laboratory diagnosis, the lack of infrastructure and scarce research work on fungal infections in Southeast Asian countries, resulting in shortage of publications. In regions as the Highlands of China, Laos, Vietnam, Cambodia, Burma, Iran, Bangla-Desh, Indonesia, which have favorable conditions for *S. schenckii* endemic growth, the prevalence of cases must be higher than estimated by published literature.⁶² In India, the number of cases published between 1932,⁶³ to 2012 increased,⁶⁴ partly due to higher number of medical and laboratory personnel who have the expertise to make diagnosis.⁶⁵ In the Middle East few cases have been reported from Israel.⁶⁶ Turkey,⁶⁷ two cases of equine sporotrichosis were diagnosed in the Kingdom of Saudi Arabia,⁶⁸ and one human case from Thailand.⁶⁹ In Malaysia, a small outbreak of cat's transmitted sporotrichosis was reported: Five adult male cats were presented with fight wounds on the forelimbs, cheeks and nose. The wounds did not heal, but instead several ulcerated nodules developed above the eyes, on the nose and behind both ears. All cats were confirmed to have sporotrichosis by culture.

Four veterinary studies who handled these cats were scratched or bitten, and three weeks later developed suppurative skin ulcers. *S. schenckii* was observed in biopsy samples taken from skin or lymph node of two students. The owner of a surviving cat, also presented similar symptoms.⁷⁰

In Rio de Janeiro and nearby municipalities of Brazil, highest incidence of feline disease was observed, namely in males cats of reproductive age. The presence of *Sporothrix schenckii* in the skin, oral cavity, nasal fossae and nails of cats,⁷¹ together with the habits of leaving home to roam; the frequent scratching of soil, woods and the disputes with other cats, surely favored the epizootic spread of the fungus, into the feline, canine and human populations.^{4,39,40} In epidemic transmission areas, many subclinical infections and spontaneous cure may have gone unnoticed. However, the lack of research studies on the feline immune response against the fungus leaves many questions unanswered.

Probably, the widespread cutaneous lesions recorded in cats, have occurred because of self-trauma, grooming, bites from other cats and hematogenous dissemination, such diagnosis is considered likely if the cat presents with a history of lethargy, depression, anorexia and fever. The repeated isolation of *Sporothrix schenckii* from sick cat's blood and testis, suggested that acute dissemination may be more frequent, than previously reported in animal models.⁷² Also because of high burden of yeast-cells in feline lesions, the laboratory diagnosis of sporotrichosis is often possible by cytological examination (Clinkenbeard KD. Diagnostic cytology: Sporotrichosis. The Compendium. Small Animal. 1999; 13: (No 2) 207-212). It is important for veterinarians to be aware that in some cats and dogs, the organism may be difficult to see in smears or histological sections, and highlights the importance of submitting a fresh tissue sample for fungal culture, when sporotrichosis-leishmaniasis or cryptococcosis are considered in the differential diagnosis. Recently, a technique involving DNA-extraction and polymerase-chain-reaction amplifi-

cation from a tissue biopsy specimen was used in diagnosing sporotrichosis in cats.⁷³ Currently, the test is not commercially available. Cost is an important consideration when choosing treatments. In Latin Americans fluconazol, itraconazole and terbinafine in generic formulations⁵² are available, the cure-rate may be good in fixed and cutaneous lymphatic forms, but the prognosis is bad in disseminated cases and malnourished animals.⁷⁴

Most general physicians and dermatologists do not know or don't give proper attention, to cat's role as important source of sporotrichosis-transmission. Frequently, they attribute human infection to contacts with organic soils, plants and mosses, and forged completely the possibility of zoonotic infections from scratches-bites or skin's secretions of diseased cats. Veterinarians also ignore a basic rule of felines dermatology «Ulcerated skin lesions observed in cats, may potentially be produced by neoplasia, cryptococcosis or sporotrichosis» (Larsen CE. University of Sao Paulo, Brazil, 2001). In tropical countries, mucocutaneous leishmaniasis, paracoccidioidomycosis, tuberculosis, coccidioidomycosis and blastomycosis should be considered in the differential diagnosis of HIV-sporotrichosis patients, with disseminated cutaneous lesions.

In dogs, the fixed cutaneous form was most commonly reported. Multiple and firm nodules, ulcerated plaques with raised borders or, annular crusted and alopecic areas have been observed on the head, pinnae or trunk. In the Brazilian canine epizootic, the nose was affected in 25 (56.8%), nasal mucosal involvement 9 (20.5%), and three cases with isolated mucosal lesions, however, the presence of sick cats in the homes of humans and dogs with sporotrichosis was reported in 83%. The high incidence of muzzle lesions in dogs, was explained by the habit to sniff their environment, and the injuries caused by cats. Dogs usually have a scarcity of yeast-fungal cells seen in histological sections, but well organized granulomas formation was reported in 45.2%. Canine disease is easily treated and has a good prognosis, in contrast, cats

frequently had a severe disease, often systemic and difficult to treat. So far, there is no reports of human cases associated with contamination from dogs. All infected animals should be handled with care, gloves and protective clothing should be worn when samples are taken of exudates or tissues and, these should be carefully removed and disposed. The arms, wrists and hands should be washed in chlorhexidine gluconate or povidone-iodine.⁷⁵

The large number of sporotrichosis-HIV-infected patients, was probably due to the overlapping epidemics in the State of Rio de Janeiro, and the poverty, low-income of the affected population, with precarious health service. In the period 2005-2008, there was an epidemic increase of AIDS-sporotrichosis, all patients except one came from areas with zoonotic-epidemic spread, and two thirds of patients gave a history of transmissions from cats with sporotrichosis. Men were most affected by HIV, because in Brazil the sex-rate male/female, recorded in the ongoing AIDS epidemic was 1.5. Severe, disseminated forms were observed in HIV-infected patients when CD4+ counts were of <200 cells/ul, frequently they also showed mucosal, bones and CNS attacks, and conjuntival mucosa involvement, but nasal mucosa was the most common site of extracutaneous lesions 14.3% in the series.⁷⁶⁻⁸⁷ In terms of clinical evolution and treatment response, 81% were cured regardless the immune status or clinical-type, most patients received 100 mg oral itraconazole/daily and associated highly active antiretroviral therapy (HAART), with excellent response.^{76,77} In conclusion: good and timely clinical-epidemiologic research, and high-quality laboratory-work, with the appropriate use of chemotherapy are final products of an excellent medical education, team-working multidisciplinary research, and the rich production of the many good publications generated by IPEC/Fiocruz researchers.⁸⁸⁻⁹⁸ Clearly, zoonotic sporotrichosis is an important mycosis in Brazil, and there is much to be learned about the natural

history, epidemiology and ecology of *S. schenckii*. The goal of disease prevention is of particular interest for this low-iricome population of the «favelas», given the limited access to medical care and lack of affordable therapy.

Acknowledgments

This paper is dedicated in memoriam of my mentor Professor Antonio González-Ochoa; he was an exemplary investigator, outstanding Tropical Dermatologist and excellent Teacher. I also thank my friends and colleagues: Drs. Pedro Lavalle, Roberto Arenas, Alejandro Bonifaz, Jorge A. Mayorga-Rodríguez, Beatriz Bustamante, John Willard Rippon, Carol A. Kauffman, Denis M. Dixon, Hester F. Vismer, Peter G Pappas, F. Bruce Coles, María Clara G. Galhardo, Laerte Ferreiro, Everardo López-Romero, A. Thomas Londero and the lates Fernando Latapí, Carlos da Silva-Lacaz, Hernán Miranda, and Juan E. Mackinnon.

References

1. Carrada-Bravo T. Sporotrichosis: Recent advances in laboratory diagnosis, histopathology and epidemiology in Mexico. *Rev Latinoamer Patol Clin Med Lab* 2012; 59: 147-171. Free copy: <http://www.medigraphic.com/patologiaclinica> (In Spanish).
2. Bonifaz A, Vazquez-Gonzalez D. Sporotrichosis: an update. *G Ital Dermatol Venereol*. 2010; 145: 659-573.
3. Bastos de Lima-Barros M, de Almeida-Paes M, Oliveira-Schubach A. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. *Clin Microbiol Rev* 2011; 24: 633-654.
4. Carrada-Bravo T. New Observations on the epidemiology of sporotrichosis and *Sporothrix schenckii* complex I. Sources of infection and occupational risk. *Rev Latinoamer Patol Clin Med Lab* 2012; 59: 88-100. Free copy: <http://www.medigraphic.com/patologiaclinica>
5. Kauffman CA. Sporotrichosis. State-of the Art Clinical Article. *Clin Infect Dis* 1999; 29: 231-237.
6. Lopez-Romero E, Reyes-Montes MR, Perez-Torres A, Ruiz-Vaca E, Villagomez-Castro JC, Mora-Montes H et al. *Sporothrix schenckii* complex and sporotrichosis, an emerging health problem. *Future Microbiol* 2011; 6: 85-102.
7. Kwon-Chung KJ, Bennet JE. Sporotrichosis (Chapter 26) In: Kwon-Chung KJ (ed). *Medical Mycology*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1992: 707-729.
8. Arenas R. Sporotrichosis. In: Merz WG, Hay R (eds). *Topley and Wilson & Microbiology & Microbial infections*. 10th ed. London: Hodder-Arnold, 2005: 367-384.
9. Guarro J, Gene J, Stchigel M. Developments in fungal taxonomy. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12: 454-500.

10. Dixon DM, Salkin IF, Duncan RA. Isolation and characterization of *Sporothrix schenckii* from clinical and environmental sources associated with the largest U. S. epidemic of sporotrichosis. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 1106-1113.
11. Ghosh AP, Maity PK, Hemashettar BM, Sharma VK, Chakrabarti A. Physiological characters of *Sporothrix schenckii* isolates. *Mycoses* 2002; 45: 449-454.
12. Valle-Aviles L, Valentin-Berrios S, Gonzalez-Mendez R, Rodriguez-Del Valle N. Cytosolic phospholipase A 2: a member of the signaling pathway of a new G protein alpha subunit in *Sporothrix schenckii*. *BMC Microbiol* 2007; 7: 107-110.
13. Valle-Aviles L, Valentin-Berrios S, Gonzalez-Mendez R, Rodriguez-Del Valle N. Functional, genetic and bioinformatics characterization of a calcium/calmodulin kinase gene in *Sporothrix schenckii*. *BMC Microbiol* 2007; 7: 107-112.
14. Tsuboi R, Sanada T, Takamori K, Ogawa H. Isolation and properties of extracellular proteinases from *Sporothrix schenckii*. *J Bacteriol* 1987; 169: 4104-4109.
15. Vismer HF, Hull PR. Prevalence, epidemiology and geographical distribution of *Sporothrix schenckii* infection in Gauteng, South Africa. *Mycopathologia* 1997; 137: 137-143.
16. Coles FB, Schuchat A, Hibbs JR. A multistate outbreak of sporotrichosis associated with sphagnum moss. *Am J Epidemiol* 1992; 136: 475-487.
17. Dooley DP, Bostic PS, Beckius ML. Spook-house sporotrichosis: a point source outbreak of sporotrichosis associated with hay bale props in a Halloween haunted house. *Arch Intern Med* 1997; 157: 1885-1887.
18. Da Rosa AC, Scroferneker ML, Vettorato R. Epidemiology of sporotrichosis: a study of 304 cases in Brazil. *J Am Acad Dermatol* 2005; 52: 451-459.
19. Reed KD, Moore FM, Geiger GE, Stemper ME. Zoonotic transmission of sporotrichosis: a case report and review. *Clin Infect Dis* 1993; 16: 384-387.
20. Conti-Diaz IA. Epidemiology of sporotrichosis in Latin America. *Mycopathologia* 1989; 108: 113-116.
21. Cooper CR, Dixon DM, Salkin IF. Laboratory-acquired sporotrichosis. *J Med Vet Mycol* 1992; 30: 169-171.
22. Powell KE, Taylor A, Phillips BJ. Cutaneous sporotrichosis in forestry workers. Epidemic due to contaminated sphagnum moss. *JAMA* 1978; 240: 232-235.
23. Kenyon EM, Russell LH, Mc Murray DN. Isolation of *Sporothrix schenckii* from potting soil. *Mycopathologia* 1984; 87: 128-129.
24. Wheeler MH, Bell AA. Melanin's and their importance in pathogenic fungi. In: Mc Ginnis M (ed). *Current Topics in Medical Mycology*. Vol 2. New York: Springer Verlag, 1987: 338-387.
25. Staib F. Isolation of *Sporothrix schenckii* from the floor of an indoor swimming pool. *Zentralblatt für Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene* 1983; B 177: 499-506.
26. Kazanas N. Pathogenic fungi isolated from desiccated mushrooms, seaweed, anchovies and rice sticks imported from the Orient. *J Food Protection* 1987; 50: 933-939.
27. Cooke WB, Foter MJ. Fungi in bedding materials. *Applied Microbiol* 1958; 6: 169-173.
28. Dixon DM, Duncan RA, Hurd NJ. Use of a mouse model to evaluate clinical and environmental isolates of *Sporothrix spp* from the largest US Epidemic of Sporotrichosis. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 951-954.
29. Lilienfeld AM, Lilienfeld DE. *Foundations of Epidemiology*. 2nd ed. New York: Oxford University Press, 1980.
30. Findlay GH. The epidemiology of sporotrichosis in the Transvaal. *Sabouraudia* 1970; 7: 231-236.
31. Findlay GH, Vismer HF, Dreyer L. Studies on sporotrichosis. Pathogen city and morphogenesis in the Transvaal strain of *Sporothrix schenckii*. *Mycopathologia* 1984; 87: 85-93.
32. Howard DH, Orr GF. Comparison of strains of *Sporothrix schenckii* isolates from nature. *J Bacteriol* 1963; 85: 816-821.
33. Mackinnon JE, Conti-Diaz IA, Gezuele E, Civila E, Da Luz S. Isolation of *Sporothrix schenckii* from nature and considerations on its pathogen city and ecology. *Sabouraudia* 1969; 7: 38-45.
34. Mackinnon JE, Conti-Diaz IA. The effect of temperature on sporotrichosis. *Sabouraudia* 1962; 2: 56-59.
35. Shippee JK. A study of potential sources of *Sporothrix schenckii* in the processing of *Sphagnum* moss. M.S. thesis. Madison: University of Wisconsin, 1970.
36. Fukushima R. Epidemiology and ecology of sporotrichosis in Japan. *Zentralbl Bacteriol Microbiol Hyg (A)* 1984; 257: 228-233.
37. Gosh A, Chakrabarti A, Sharma VK, Singh K, Singh A. Sporotrichosis in Himachal Pradesh (North India). *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1999; 93: 41-45.
38. Bustamante B, Campos PE. Endemic sporotrichosis. *Curr Opin Infect Dis* 2001; 14: 145-149.
39. Schubach A, Barros MB, Wanke B. Epidemic sporotrichosis. *Curr Opin Infect Dis* 2008; 21: 129-133.
40. Barros MB, Schubach A de O, do Valle AC, Gutierrez-Galhardo MC, Silva FC, Schubach TM et al. Cat transmitted sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: description of a series of cases. *Clin Infect Dis* 2004; 38: 259-265.
41. Saraiva-Freitas DF, do Valle AC, de Almeida-Paes R, Bastos FI, G Galhardo MC. Zoonotic Sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: A Protracted Epidemic Yet to be Curbed *Clin Infect Dis* 2010; 50: 453.
42. Schubach TM, Schubach A, Okamoto T, Barros MB, Figueredo FB, Cuzzi T et al. Evaluation of an epidemic of sporotrichosis in cats: 347 cases (1998-2001). *J Am Vet Med Assoc* 2004; 224: 1623-1632.
43. Schubach TM. Canine sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: clinical presentation, laboratory diagnosis and therapeutic response in 44 cases (1998-2003). *Med Mycol* 2006; 44: 87-92.
44. Freitas DF, de Siqueira-Hoagland B, do Valle AC, Fraga BB, de Barros MB, de Oliveira-Schubach A et al. Sporotrichosis in HIV-infected patients: report of 21 cases of endemic sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Med Mycol* 2012; 50: 170-178.
45. Mitsumo-Carvalho MT, de Castro AP, Baby C, Werner B, Neto JF, Queiroz-Telles F. Disseminated cutaneous sporotrichosis in a patient with AIDS: Report of a case. *Rev Soc Bras Med Trop* 2002; 35: 655-659.
46. Neto RD, Machado AA, de Castro G, Quaglio AS, Martinez R. Acquired immunodeficiency syndrome presenting as disseminated cutaneous sporotrichosis-case report. *Rev Soc Bras Med Trop* 1999; 32: 57-61.
47. Pacheco-Schubach TM, de Oliveira-Schubach A, Santos dos Reis R, Cuzzi-Maya T, Moita-Blanco TC, Ferreira-Monteiro D et al. *Sporothrix schenckii* isolated from domestic cats with and without sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Mycopathologia*. 2001; 153: 83-86.
48. Santos-Reis R, Almeida-Paes R, de Medeiros-muniz M, Morais e Silva-Tavares P, Fialho-Monteiro P, Pacheco-Schubach TM et al. Molecular characterization of *Sporothrix schenckii* isolates from humans and cats involved in the sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104: 769-774.
49. Schubach T, Valle A, Gutierrez-Galhardo M, Monteiro PC, Reis RS, Zancopé-Oliveira R et al. Isolation of *Sporothrix schenckii* from the nails of domestic cats (*Felis catus*) *Med Mycol* 2001; 39: 147-149.

50. Barbee WC, Ewert A, Davidson EM. Animal model of human disease: Sporotrichosis. *Am J Pathol* 1977; 86: 281-284.
51. Kano R, Watanabe K, Murakami M. Molecular diagnosis of feline sporotrichosis. *Veterinary Records* 2005; 156: 484-485.
52. Crothers SL, White SD, Ihrke PJ, Affolter V. Sporotrichosis: a retrospective evaluation of 23 cases seen in northern California ESVD and ACVD. 2009; 20: 249-259.
53. Dunstan RW, Langham RF, Reimann KA. Feline sporotrichosis: a report of five cases with transmission to humans. *J Amer Acad Dermatol* 1986; 15: 37-45.
54. Bastos de Lima-Barros M, Oliveira-Schubach A, de Vasconcellos Carvalhaes de Oliveira R, Bautista-Martins E, Liporage-Teixeira J et al. Treatment of Cutaneous Sporotrichosis With Itraconazole-Study of 645 Patients. *Clin Infect Dis* 2011; 52: e200-e206.
55. Severo LC, Festugato M, Bernardi C, Londero AT. Widespread Lesions due to *Sporothrix schenckii* in Patient Under a Long Term Steroid Therapy. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 1999; 41: 8-17.
56. Padhye AA, Ajello J. Sporotrichosis an occupational hazard for nursery workers, tree planters and orchid growers. *Am Orchid Soc Bull* 1990; 59: 613-616.
57. Zhang X, Andrews JH. Evidence for growth of *Sporothrix schenckii* on dead but not on living *sphagnum* moss. *Mycopathologia* 1993; 123: 87-94.
58. Carrada-Bravo T. New observations on the epidemiology and pathogenesis of sporotrichosis. *Ann Trop Med Parasitol* 1975; 69: 267-273.
59. Hajjeh R, McDonnell S, Reef S, Licitra C, Hankins M, Toth B et al. Outbreak of sporotrichosis among Tree Nursery Workers. *J Infect Dis* 1997; 176: 499-504.
60. Coles BF, Schuchat A, Hibbs JR. A multistate outbreak of sporotrichosis associated with sphagnum moss. *Am J Epidemiol* 1992; 136: 475-487.
61. Mahajan VK, Sharma NL, Shanker V, Gupta P, Mardi K. Cutaneous sporotrichosis unusual clinical presentations. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2010; 76: 276-280.
62. Newton PN, Chung WH, Phetsouvanh R, White NJ. Sporotrichosis, plains of Jars, Laos People's Democratic Republic. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 1496-1497.
63. Ghosh LN. An unusual case of sporotrichosis. *Ind Med Gaz* 1932; 67: 570-571.
64. Mahajan K, Sharma NL, Sharma RC, Gupta ML, Garga G, Kanga AK. Cutaneous sporotrichosis in Himachal Pradesh, India. *Mycoses* 2005; 48: 25-31.
65. Singh-Mehta KI, Sharma NL, Kanga AK, Mahajan VK, Ranjan N. Isolation of *Sporothrix schenckii* from environmental sources of cutaneous sporotrichosis patients in Himachal Pradesh, India: result of a pilot study. *Mycoses* 2007; 50: 496-501.
66. Feuerman EJ, Alteras I, Bashan D, Lehrer NB. Isolation of *Sporothrix schenckii* in the soil in relation to a new case in man. *Sabouraudia* 1976; 14: 217-222.
67. Coskun B, Saral Y, Akpolat N, Ataseven A, Cicek D. Sporotrichosis successfully treated with terbinafina and potassium iodide: Case report and review of literature. *Mycopathologia* 2004; 158: 53-56.
68. Al-Dughaym AM, Fadlelmula A. Equine Sporotrichosis in Saudi Arabia: The first report f two mares and treatment with natamycin. *The Sudan J Vet Res* 2003; 18: 55-61.
69. Kwangskustiich C, Vanittanakom N, Khanjanashiti P, Uthammachai C. Cutaneous sporotrichosis in Thailand: first reported case. *Mycoses* 1990; 33: 513-517.
70. Zamri-Saad M, Salmiyah TS, Jasni S, Cheng BY, Basri K. Feline sporotrichosis: an increasingly important zoonotic disease in Malaysia. *Vet Record* 1990; 127: 480-481.
71. Schubach T, Valle A, Gutierrez-Galhardo M, Monteiro PC, Reis RS, Zancopé-Oliveira R et al. Isolation of *Sporothrix schenckii* from the nails of domestic cats (*Felis catus*) *Med Mycol* 2001; 39: 147-149.
72. Barbee WC, Ewert A, Davidson EM. Animal model of human disease: Sporotrichosis. *Am J Pathol* 1977; 86: 281-284.
73. Kano R, Watanabe K, Murakami M. Molecular diagnosis of feline sporotrichosis. *Veterinary Records* 2005; 156: 484-485.
74. Crothers SL, White SD, Ihrke PJ, Affolter V. Sporotrichosis: a retrospective evaluation of 23 cases seen in northern California (1987-2007). *Journal compilation ESVD and ACVD.* 2009; 20: 249-259.
75. Dunstan RW, Langham RF, Reimann KA. Feline sporotrichosis: a report of five cases with transmission to humans. *J Amer Acad Dermatol* 1986; 15: 37-45.
76. Bastos de Lima-Barros M, Oliveira-Schubach A, de Vasconcellos-Cavalhaes de Oliveira R, Bautista-Martins E, Liporage-Teixeira J et al. Treatment of Cutaneous Sporotrichosis With Itraconazole-Study of 645 Patients. *Clin Infect Dis* 2011; 52: e200-e206.
77. Severo LC, Festugato M, Bernardi C, Londero AT. Widespread lesions due to *Sporothrix schenckii* in patient under a long term steroid therapy. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 1999; 41: 8-17.
78. Gutierrez-Galhardo MC, do Valle AC, Fraga BLB. Disseminated sporotrichosis as a manifestation of immune reconstitution inflammatory syndrome. *Mycoses* 2010; 53: 78-80.
79. Aarenstrup FM, Guerra RO, Viera BJ, Cunha RMC. Oral manifestations of sporotrichosis in AIDS patients. *Oral Dis* 2001; 7: 134-136.
80. Carvalho MTM, Castro AP, Baby C. Disseminated cutaneous sporotrichosis in a patient with AIDS report of a case. *Rev Soc Bras Med Trop* 2002; 35: 1-5.
81. Rocha MM, Dassin T, Lira R. Sporotrichosis in patient with AIDS: report of a case and review. *Rev Iberoam Micol* 2001; 18: 133-136.
82. Silva-Vergara ML, Maneira FRZ, Oliveira RM. Multifocal sporotrichosis with meningeal involvement in a patient with AIDS. *Med Mycol* 2005; 43: 187-190.
83. Vilela R, Souza GF, Fernandes G, Mendoza L. Cutaneous and meningitis sporotrichosis in a HIV patient. *Ver Iberoam Micol* 2007; 24: 161-163.
84. Gutierrez-Galhardo MC, Silva MT, Lima MA. *Sporothrix schenckii* meningitis in AIDS during immune reconstruction syndrome. *J Neurool Neurosurg Psychiatry* 2010; 81: 696-699.
85. Al-Tawfiq JA, Wools KK. Disseminated sporotrichosis fungemia as the initial presentation of human immunodeficiency virus infection. *Clin Infect Dis* 1998; 26: 1403-1406.
86. Hardman S, Stephenson I, Jenkins DR, Wiseka MJ, Johnson EM. Disseminated *Sporothrix schenckii* in a patient with AIDS. *J Infect* 2005; 51: e73-e77.
87. Romero-Caballero R, Bonifaz A, Romero-Feregrino R, Sanchez CJ, Linares Y, Tay-Zavala J et al. Disseminated sporotrichosis. *BMJ Case Reports.* 2011; doi 10.1136/ber.10.20.3404.
88. Galhardo MC, de Oliveira RM, Valle AC. Molecular epidemiology and antifungal susceptibility patterns of *Sporothrix schenckii* isolates from a cat transmitted epidemic of sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Med Mycol* 2008; 46: 141-142.
89. Batista-Martins E. Epidemiologic, clinic and Therapeutic Profiles of Sporotrichosis at Evandro-Chagas/Fiocruz Research Institute, Rio de Janeiro, in the period 2002-2004. Master in Tropical Medicine Thesis, Rio de Janeiro, Brazil, 2006.
90. Saraiva-Freitas DF. Ten years of Sporotrichosis Epidemic at Rio de Janeiro: Clinical, Epidemiologic and Therapeutic Study of cases studied at the Evandro-Chagas Research Institute, 2005-2008. Master in Science Thesis (Infectious Diseases), Rio de Janeiro, Brazil, 2009.

91. Bernardo-Tavares da Silva M. Socio space Distribution of human sporotrichosis Patients studied at the Evandro-Chagas Research Institute, 1997-2007 at the State of Rio de Janeiro. Master in Science Thesis (Public Health) Rio de Janeiro, Brazil, 2010.
92. Barros MBL, Schubach AO, Galhardo MC. Sporotrichosis with widespread cutaneous lesions a report of 24 cases related to transmission by domestic cats in Rio de Janeiro, Brazil. *Int J Dermatol* 2002; 41: 114-116.
93. Gutierrez-Galhardo MC, Barros MBL, Schubach A. Erythema multiform associated with sporotrichosis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2005; 19: 507-509.
94. Schubach A, Barros MBL, Pacheco-Schubach TM, Francesconi-Valle AC, Gutierrez-Galhardo MC et al. Primary conjunctiva sporotrichosis. Two cases From a Zoonotic Epidemic in Rio de Janeiro, Brazil. *Case Reports. Cornea* 2005; 24: 491-493.
95. Barros MBL, Schubach A, Schubach TMP. An epidemic of sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil. Epidemiologic aspects of a series of cases. *Epidemiol Infect* 2007; 21 Nov (Pub ahead of print).
96. Liporage-Teixeira J et al. Endemic of Zoonotic Sporotrichosis. Profile of Cases in Children. *Pediatr Infect Dis J* 2008; 27: 246-250.
97. Schubach TMP, Schubach AO, Okamoto T. Hematogenous spread of *Sporothrix schenckii* in cats with naturally acquired sporotrichosis. *J Small Anim Pract* 2003; 44: 395-398.
98. Francesconi G, Valle ACF, Passos SR, Reis RS, Galhardo MCG. Terbinafina (250 mg/Day): an effective and safe treatment of cutaneous sporotrichosis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2009; 11: 1273-1276.

La mioglobina como marcador del infarto agudo del miocardio en pacientes con síndrome coronario agudo

Palabras clave: Mioglobina, síndromes coronarios agudos, infarto agudo del miocardio.

Key word: Myoglobin, acute coronary syndromes, acute myocardial infarction.

Recibido: 30/06/2012
Aceptado: 29/11/2012

Este artículo puede ser consultado en versión completa en:
www.medigraphic.com/patologiaclinica

José Raúl Dopico Paz,* Yamilka Valdés Macola,** LLudénich Osoria Mengana,** Isabel Giraldo Falero,* Enrique Abraham Marcel***

* Empresa de Producción de Biológicos «Carlos J. Finlay», Cuba.
** Hospital Calixto García, Cuba.
*** Ministerio de Salud Pública, Cuba.

Correspondencia:
MSc. José Raúl Dopico Paz
Infanta No 1162, esquina a Manglar,
Centro Habana, CP 10400, La Habana, Cuba.
Tel: (537) 870 8081 al 86 exts. 130, 131, 151
E-mail: mdopicopaz@iglesiaticolica.cu

Resumen

El propósito de este trabajo fue la evaluación del comportamiento de la mioglobina como método diagnóstico en pacientes con síndromes coronarios agudos (SCA). Se realizó un estudio descriptivo longitudinal prospectivo con los pacientes que ingresaron al Hospital «Calixto García» con diagnóstico de síndromes coronarios agudos. El grupo estuvo conformado por 45 pacientes: 29 sujetos con síndromes coronarios agudos con elevación del segmento ST (SCA-CEST) y 16 con síndrome coronario agudo sin elevación del segmento ST (SCA-SEST). La edad, sexo y antecedentes patológicos personales de riesgo cardiovascular fueron las variables relacionadas con la cinética del marcador cardíaco. Las pruebas estadísticas para evaluar normalidad se realizaron a través de los test de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilks. Para el análisis univariado se utilizaron las pruebas ANOVA y t de Student en el caso de las variables cuantitativas. Para las variables cualitativas o categóricas las pruebas de Chi cuadrada y exacta de Fisher. La concordancia se calculó según el índice de Kappa de Fleiss y las pruebas de validez diagnóstica. Se consideró un nivel de significación $p \leq 0,05$. La mioglobina tuvo una sensibilidad de 90.9% y especificidad de 75% en el diagnóstico de síndrome coronario agudo dentro de las primeras cinco horas de iniciado el dolor y se encontró asociación entre valores positivos de mioglobina y variables clínicas en la predicción de eventos fatales en el síndrome coronario agudo.

Abstract

The purpose of this study was to evaluate the behavior of myoglobin as a diagnostic method in patients with acute coronary syndromes (ACS), for these a prospective longitudinal descriptive study was developed with the patients that were attended at the «Calixto García» Hospital with diagnosis of acute coronary syndromes. The group was integrated by 45 patients: 29 with acute coronary syndromes and increased segment ST and 16 with acute coronary syndromes without increased segment ST. The age, sex and personal pathology antecedent of cardiovascular risk, were the variables related with the kinetic of cardiac marker. The statistic test for evaluate normality was realized by mean of the Shapiro-Wilks and Kolmogorov-Smirnov tests. For the single variable analysis was used the ANOVA and Student's t Tests in the case of quantitative variable. For the qualitative variables or categories, Chi square and Fisher exact tests were employed. The concordance was calculated by the Fleiss Kappa Index and diagnosis validity test. It was considered as a signification level $p \leq 0.05$. The myoglobin had a sensitivity of 90.9% and specificity of 75% in the diagnosis of acute coronary syndrome during the first five hours after initiation of pain and it was found association between positives values of myoglobin and clinical variables in the prediction of fatal events in the acute coronary syndrome.

Introducción

Las estadísticas internacionales de los últimos años mostraron que las enfermedades del corazón provocaron 15 millones de muertes cada año y constituyeron la primera causa de fallecimientos en los países desarrollados en el siglo XX, aportando más de 50% a la mortalidad general.¹

En Cuba, desde hace más de 20 años, las enfermedades del corazón son la primera causa de muerte.² Al cierre del 2010, la situación de salud del país se caracterizó por incremento en la mortalidad general, aumento de los años de vida potencialmente perdidos, baja mortalidad por enfermedades infecciosas y elevada morbimortalidad por enfermedades crónicas no transmisibles, siendo las enfermedades del corazón el primer lugar dentro de las cinco primeras causas de muerte.³

El diagnóstico de síndrome coronario agudo (SCA) puede ser difícil en las primeras horas de atención del paciente, hecho que lo pone en riesgo de complicaciones. La morbimortalidad en el SCA guarda relación con la presencia o no de necrosis miocárdica; por lo tanto, los marcadores séricos de daño miocárdico se destacan por su importante papel en el diagnóstico y en el pronóstico, pudiendo éstos ser usados como guía para la terapéutica.

En la actualidad, debido a la necesidad de diagnosticar rápidamente el infarto agudo del miocardio (IAM), se están investigando nuevos marcadores séricos, así como una prueba rápida a la cabecera del paciente, con marcadores ya existentes que ayuden al diagnóstico del IAM, sobre todo en los servicios de urgencias.⁴

En los últimos años, se ha estado evaluando la aplicabilidad de los nuevos criterios de IAM; específicamente con uno de sus marcadores de daño miocárdico, las troponinas, reconociéndose sus ventajas y limitaciones. Para el diagnóstico de infarto, éstas se circunscriben fundamentalmente a los casos dudosos, pudiendo identificar necrosis miocárdica en situaciones que de otra forma serían clasificadas como angina sin necrosis miocárdica.

Otros son menos sensibles como la mioglobina, la aspartato aminotransferasa (TGO) y la deshidrogenasa láctica (LDH).^{5,6}

El comportamiento del nivel sérico en forma de curva de los diferentes biomarcadores (enzimáticos o no), le permite ser útil en el SCA. Entre los más precoces está la mioglobina, le sigue la creatina quinasa (CK) total y las troponinas, por su seguridad diagnóstica y valor pronóstico.⁶

En un estudio realizado por Apple y colaboradores emplearon una determinación simultánea de CK-MB, troponina I y mioglobina. La sensibilidad de la troponina I para detectar infarto a partir de las 12 horas de comenzado el dolor es mayor que la de los otros dos parámetros, pero antes de las seis horas la sensibilidad de la mioglobina y de la CK-MB es superior a la de la troponina I.⁷

La mioglobina es una proteína de bajo peso molecular, muy utilizada como marcador del IAM, sobre todo por ser más precoz en relación con otros biomarcadores, alcanzando niveles séricos útiles para diagnóstico a partir de las tres horas, y un pico máximo aproximado entre las seis a 12 horas y cediendo a las 24 horas; por otro lado, tiene un alto valor predictivo negativo. Su uso es realmente favorable para la toma de decisiones precoces.^{4,6}

Son múltiples los métodos analíticos de laboratorio de la mioglobina, entre los que destaca el inmunoensayo de látex-aglutinación, el inmunoturbidimétrico y otros, cada uno con diferentes costos y rangos limítrofes. También se marcan diferencias de sensibilidad y especificidad de este biomarcador entre los diferentes laboratorios, siendo ya controversial. Aun así, la mioglobina se ha seguido utilizando, pero ya se prefiere usar unida a otro biomarcador como las troponinas o la CK total, aprovechándose la precocidad de la mioglobina que comienza a elevarse dentro de las dos a seis horas del infarto y la seguridad de otros biomarcadores como las troponinas I que se elevan dentro de las cuatro a siete horas del evento y se mantienen por encima de los valores normales por siete a 14 días, así como las CK total que comienzan a elevarse

entre las 16 a 20 horas y descienden entre las 21 a 25 horas de haber ocurrido el infarto.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el comportamiento de la mioglobina como método diagnóstico en pacientes con síndrome coronario agudo.

Materiales y métodos

Se realizó un estudio descriptivo longitudinal prospectivo que incluyó 45 pacientes, que acudieron al Servicio de Urgencia del Hospital Universitario «General Calixto García» entre octubre y diciembre del 2009 por dolor torácico sugestivo de síndrome coronario agudo (SCA), con evolución inferior a 12 horas del inicio de los síntomas, los cuales fueron ingresados en la Unidad de Cuidados Intensivos Coronarios de dicho hospital.

Todos los pacientes fueron valorados por el especialista de Cardiología y el residente responsable de esta investigación. Fueron excluidos de este estudio enfermos con antecedentes de insuficiencia renal, convulsiones o traumatismo reciente, así como pacientes a quienes se hubiera practicado desfibrilación o masaje cardiaco reciente o con dolencia del músculo esquelético.⁸

Procesamiento de la muestra. A los pacientes se les realizó una primera extracción de sangre venosa (5 mL) en el Servicio de Urgencias y luego otras tres extracciones seriadas en la Unidad de Cuidados Intensivos Coronarios entre las ocho, 16 y 24 horas del inicio de los síntomas.

La muestra se obtuvo por punción venosa, utilizando jeringuilla con aguja desechable y colocada en un tubo de ensayo; posteriormente fueron trasladadas al laboratorio clínico y, después de traído el coágulo, se centrifugaron, decantándose el suero y enviándose a la Empresa de Producción de Biológicos «Carlos J. Finlay», en Cuba, donde se le realizaron, en el caso de la mioglobina, determinaciones analíticas con el método inmuno-turbidimétrico, utilizando un juego de reactivos de la firma alemana Dyasys.⁹

La concentración de mioglobina se calculó mediante una curva de calibración, utilizando para ello un calibrador DiaSysTruCal de la misma firma. Límite de prueba: 5 µg/L. Intervalo de referencia: 6-85 ng/mL. Hombres: < 92 ng/mL. Mujeres: < 76 ng/mL.

En el caso de la CK total (patrón de referencia), el análisis de las muestras se realizó mediante un método de determinación de la actividad enzimática en forma cuantitativa con un juego de la misma empresa. Intervalo de referencia: 144-210 U/L. Hombres: 24-195 U/L. Mujeres: 24-170 U/L.

Todas estas determinaciones se realizaron en un equipo analizador BM/Hitachi de la casa comercial Roche Diagnostic.¹⁰

Procesamiento estadístico. De acuerdo con el tipo y escala de las variables, los resultados se expresan en valores medios y tablas de frecuencias.

El análisis para probar normalidad se realizó a través de las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilks. Para el análisis univariado se utilizó las pruebas ANOVA y t de Student, en el caso de las variables cuantitativas. Para las variables cualitativas o categóricas el test de (χ^2) y prueba exacta de Fisher. Cuando los grupos de comparación no distribuían normal y el número de pacientes fue menor de 20, se utilizó el método no paramétrico U Mann Whitney para observaciones independientes.

La concordancia se calculó según el índice de Kappa de Fleiss.¹¹ Se graficó la curva ROC para integrar la sensibilidad y especificidad; la significación de dichas curvas se evaluó a partir del cálculo del intervalo de confianza (IC) del área bajo la curva y se interpretó como significativa aquel valor del área cuyo límite inferior fue superior a 0.5; un índice entre 0.8 y 0.9 es bueno y excelente si es 1.¹²

Las curvas de supervivencia libre de eventos observados se calcularon a partir del método de regresión de Cox (curvas de Kaplan-Meier).

Los análisis se realizaron para estudios de dos colas. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0.05$ y se calcularon los intervalos de confianza para 95%.

Para el estudio del rendimiento diagnóstico y pronóstico de la mioglobina se utilizaron medidas de validez: sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivos y negativos, tomándose como prueba de referencia la determinación de CK total, así como razones de probabilidad, lo cual nos permite medir cuánto más probable es un resultado concreto (positivo o negativo), según la presencia o ausencia de la enfermedad.¹³

Se creó un modelo de recolección de datos y una base de datos en Excel para el estudio. Todos los cálculos se realizaron con el paquete estadístico SPSS versión 16.0.

Resultados

El estudio realizado estuvo conformado por 45 pacientes que acudieron al Servicio de Urgencia del Hospital Universitario «General Calixto García» con síntomas y signos sugestivos de isquemia miocárdica aguda.

Como se aprecia en la *figura 1*, la mioglobina comienza a detectarse en las primeras cinco horas con pico máximo alrededor de las 6-10 horas y su descenso se observa a partir de las 16 horas, y continúa un descenso progresivo registrado hasta las 25 horas. Por otro lado, el comportamiento de los valores medios de la CK total, permite definir una curva enzimática donde los valores comienzan a elevarse entre las primeras cinco horas, alcanzando su elevación mayor entre las 16-20 horas y va descendiendo considerablemente entre 21-25 horas.

Al realizar un análisis comparativo entre las diferentes muestras de mioglobina y CK total para obtener el valor máximo (pico máximo) según toma, se encontró que el pico máximo de mioglobina se obtuvo en la segunda muestra ($t = 5.924$, $p = 0.0002$) (6-10 horas del inicio de los síntomas); mientras para la CK total alcanza el pico en la tercera muestra ($t = 2.551$, $p = 0.017$) (16-20 horas del inicio de los síntomas); a partir de esta toma comienza el descenso de mioglobina y en la

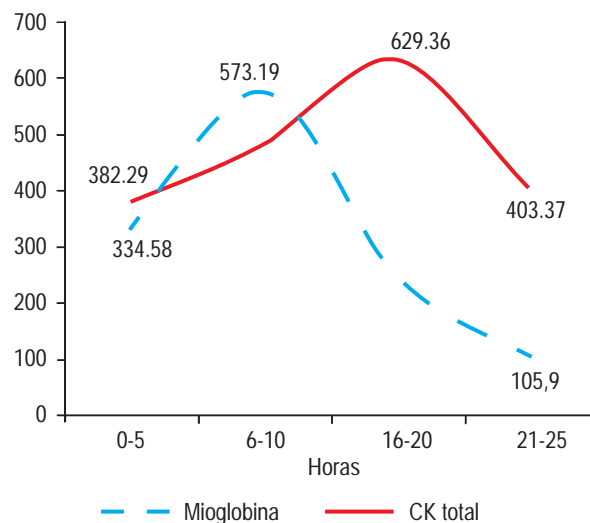


Figura 1. Valores medios de mioglobina y CK total según tiempo.

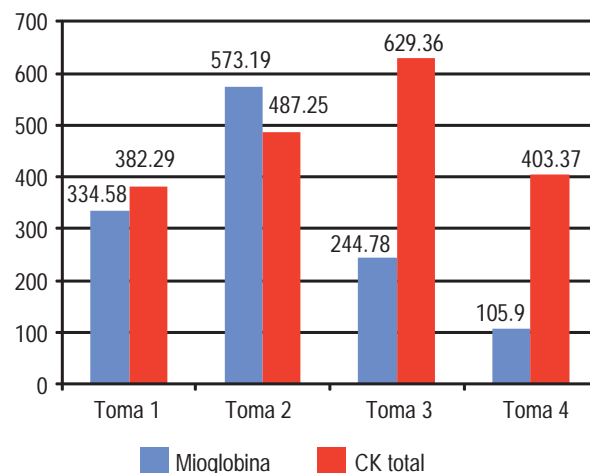


Figura 2. Comportamiento de los marcadores miocárdicos según tomas de muestras (valores medios).

cuarta toma (21-25 horas), se obtiene la caída de la CK total (*figura 2*).

Al realizar el análisis de concordancia, encontramos que la mioglobina y la CK total fueron significativamente positivas en los pacientes con síndrome coronario agudo ($K = 0.659$, $p < 0.001$). Se obtiene una sensibilidad de 90.9% y especificidad de 75% para la mioglobina y una razón de verosimilitud positiva de 3, es decir, un resultado

Cuadro I. Eficacia diagnóstica de la mioglobina en el síndrome coronario agudo (SCA).

	<i>Mioglobina positiva</i>		<i>Mioglobina negativa</i>		<i>Total</i>	
	<i>n</i>	<i>%</i>	<i>n</i>	<i>%</i>	<i>n</i>	<i>%</i>
CK total positiva	30	90.90	3	25.00	33	73.3
CK total negativa	3	9.10	9	75.00	12	26.6
Total	33	73.30	12	26.60	45	100.0

K = 0.659, p < 0.001, Se = 90.9%, E = 75%, RVP = 3.6, RVN = 0.1.

positivo de mioglobina es tres veces más probable en un paciente con síndrome coronario que en otro sujeto sin esta enfermedad. Sólo 9.1% de los pacientes con mioglobina positiva tenían CK total negativa, lo que indica la buena sensibilidad de la mioglobina para el diagnóstico del SCA limitada por su poca especificidad (*cuadro I*).

Al comparar los resultados de la mioglobina y CK total de los pacientes con SCA-CEST, se obtuvo una concordancia moderada (K = 0.512, p < 0.001), con una especificidad de 66.7% y valor predictivo negativo (VPN) de 50%. La mioglobina fue significativamente más positiva que la CK en los pacientes del grupo analizado con una razón de verosimilitud positiva de 2.8, por lo tanto, un resultado positivo de mioglobina es dos veces más probable en un paciente con síndrome coronario agudo con elevación del ST que en otro sujeto sin el mismo. En el grupo de pacientes con SCA-SEST, se obtuvo una concordancia buena (K = 0.632, p < 0.0001), con una especificidad de 77.8% y valor predictivo negativo de 87.5% y una razón de verosimilitud positiva de 3.9, lo que expresa que el resultado positivo de mioglobina es tres veces más probable en un paciente con síndrome coronario agudo sin elevación del ST que en otro sujeto sin el mismo. Sin embargo, la mioglobina no fue significativamente positiva, sólo 43.7% de los pacientes tenían mioglobina positiva; por lo tanto,

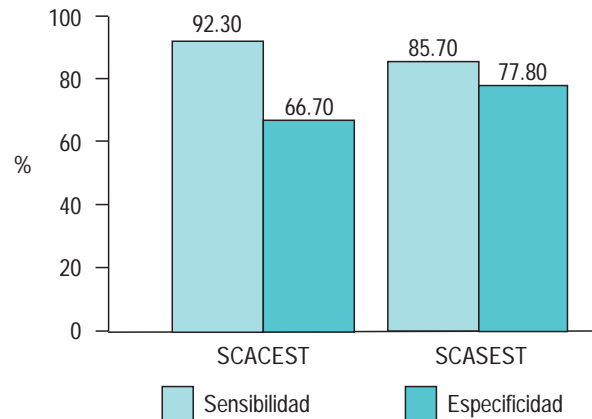


Figura 3. Eficacia diagnóstica de la mioglobina en el síndrome coronario agudo con elevación del segmento ST (SCA-CEST) y en el síndrome coronario agudo sin elevación del segmento ST (SCA-SEST).

Cuadro II. Eficacia diagnóstica de la mioglobina en el síndrome coronario agudo sin elevación del segmento ST (SCA-SEST).

	<i>Mioglobina positiva</i>		<i>Mioglobina negativa</i>		<i>Total</i>	
	<i>n</i>	<i>%</i>	<i>n</i>	<i>%</i>	<i>n</i>	<i>%</i>
CK total positiva	6	85.70	2	22.00	8	50.0
CK total negativa	1	14.28	7	78.00	8	50.0
Total	7	43.75	9	56.25	16	100.0

K = 0.632, p < 0.0001, Se = 85.7%, E = 77.8%, VPP = 75%, VPN = 87.5%, RVP = 3.9, RVN = 0.2.

se necesita de otros marcadores para mejorar la sensibilidad de la mioglobina en el diagnóstico del SCA-SEST (*figura 3 y cuadro II*).

Al realizar el análisis multivariado mediante un modelo de regresión logística, encontramos que la mioglobina, la carga de complicaciones y la carga de antecedentes patológicos personales de riesgo cardiovascular, son variables con predicción de riesgo de fallecimiento durante la primera semana de la fase hospitalaria. La mejor relación sensibilidad/especificidad pronóstica de fallecimiento a los siete

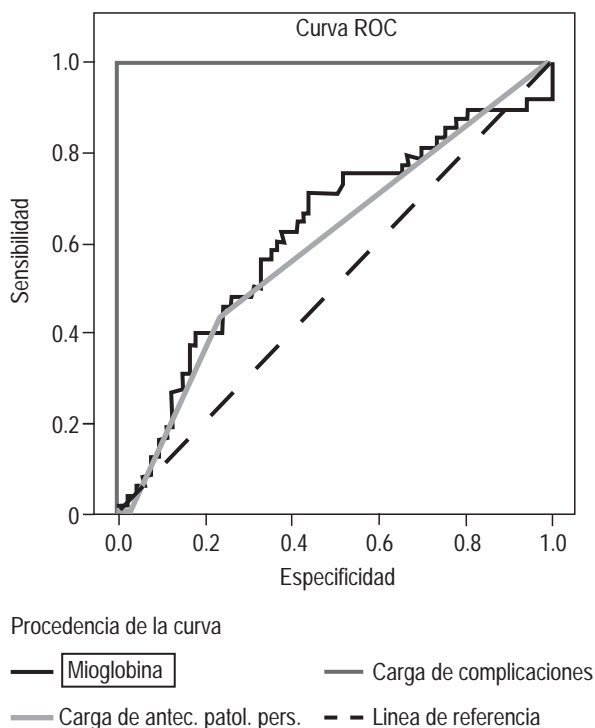


Figura 4. Curva ROC.

30

días valorada a partir del área bajo la curva ROC, la identifica la presencia de la carga de complicaciones (1.00), seguida de la positividad de la mioglobina (0.61) (figura 4).

Discusión

Esta serie estuvo constituida por 45 pacientes; los estudios analizados en nuestra revisión bibliográfica incluyeron muestras mayores,¹⁴⁻¹⁷ lo que a nuestro juicio influye en la exclusión de más pacientes y el menor número de complicaciones; de todos modos los resultados de éstos son similares a los nuestros.

Respecto al patrón electrocardiográfico del segmento ST, se tomó en cuenta tanto los SCA-CEST como los SCA-SEST. Otros estudios están relacionados con SCA-SEST exclusivamente.¹⁸⁻²² Por su parte, Chappelle y colaboradores basan su investigación en el valor diagnóstico de mioglobina y otros marcadores en la fase prehospitalaria del

síndrome coronario agudo, incluyendo pacientes con SCA-CEST y SCA-SEST, lo que coincide con nuestra investigación.²³ A nuestro juicio, este comportamiento está en concordancia con la marcada tendencia de la correlación diagnóstica de la elevación de este segmento (ST) y su coincidencia con los eventos coronarios.

Por otra parte, el comportamiento de la curva en nuestra investigación, indica claramente que la mioglobina comienza a detectarse en la sangre de los pacientes con SCA en al menos cinco horas y alcanza su pico máximo varias horas después (6-10 horas), siendo siempre más precoz que el resto de los marcadores, independientemente del método analítico empleado.

Se encontró una sensibilidad y valor predictivo negativo para mioglobina de 90.9 y 75%, respectivamente. En la literatura, existen amplias diferencias entre los resultados que analizan el valor diagnóstico en los diferentes marcadores con variaciones en la sensibilidad entre 52 y 94%, en la especificidad entre 33 y 96%, en el valor predictivo positivo (VPP) entre 46 y 98% y en el valor predictivo negativo (VPN) entre 38 y 93%.²⁴⁻²⁶

En nuestro estudio, las diferencias entre los valores de mioglobina encontradas en el SCA-SEST y SCA-CEST está en relación por la instauración del tratamiento fibrinolítico que recibieron 60% de los pacientes antes de la extracción de la primera muestra, lo que influyó en los niveles inicialmente altos tras la reperfusión para ambos marcadores estudiados.

El tamaño del área infartada puede influenciar la sensibilidad y especificidad en el SCA-CEST, la isquemia es más grande y generalmente el paciente es tratado con terapias de reperfusión que modifican la cinética de liberación de los marcadores y, en consecuencia, su utilización como detectores de necrosis miocárdica.²⁷

En nuestra muestra utilizamos el valor de corte de mioglobina para hombres de 92 ng/mL y en mujeres 76 ng/mL. Sin embargo, existen muchas diferencias entre los valores de referencia por labo-

ratorios; no hay acuerdo sobre la cifra de corte para definir la isquemia miocárdica. Nos parece adecuado mencionar que existen 36 métodos diferentes de determinación de la mioglobina y sus reactivos, entre los que se publican el látex-aglutinación, radioinmunoensayo, inmuno-turbidimétricos y otros que pudieran modificar los resultados estadísticos antes mencionados.

La existencia de diferentes valores de corte donde se incluye la mioglobina, limita su eficiencia diagnóstica, ya que no existe una única concentración que identifique de manera consensuada la necrosis miocárdica, y ésta varía dependiendo del método de medida utilizado.

Nuestro trabajo comprobó el valor pronóstico de la mioglobina y su asociación con otras variables clínicas que permiten evaluar el riesgo de eventos cardiovasculares graves en pacientes con síndrome coronario agudo (SCA).

Por otro lado, en un estudio realizado, Eggers y colaboradores con 197 pacientes con dolor torácico y electrocardiograma no diagnóstico de infarto agudo del miocardio (IAM), se estimaron los valores de troponina I, CK-MB y mioglobina para medir el rendimiento diagnóstico. Se demostró que la CK-MB y la mioglobina no tuvieron valor diagnóstico adicional.²⁸

En nuestro estudio, al realizar el análisis univariado, no demostramos posibles predictores de eficacia diagnóstica y pronóstica de la mioglobina como son: edad, sexo, características del patrón electrocardiográfico, diabetes mellitus, antecedentes de cardiopatía isquémica, hipertensión arterial y tabaquismo, en el síndrome coronario agudo (SCA).

Los pacientes complicados en nuestro estudio que presentaron valores de mioglobina positivos y más de dos factores de riesgo cardiovascular, tuvieron complicaciones durante el ingreso. Winter, en su estudio sobre el valor pronóstico de mioglobina, troponina T y CK-MB, encontró que los pacientes con mioglobina positiva tenían riesgo de presentar un evento clínico en un

periodo de 180 días, unido al resto de los otros marcadores y a los antecedentes de enfermedad arterial coronaria.¹⁷

Conclusiones

La mioglobina constituye una prueba diagnóstica precoz en el síndrome coronario agudo por su alta sensibilidad limitada por su baja especificidad durante la fase hospitalaria.

En el síndrome coronario agudo sin elevación del segmento ST (SCA-SEST), la eficacia diagnóstica de la mioglobina está limitada, requiriendo de otros biomarcadores para hacer diagnóstico de isquemia miocárdica aguda.

La elevación precoz de la mioglobina agrega información pronóstica unida a marcadores clínicos.

Referencias

1. Arencibia OTM, Ibagollin GJJ, Cabrera B. Letalidad por infarto agudo del miocardio. Revista Electrónica de Portales Médicos, 2008. [Citado 31 de agosto 2009]. Disponible en: <http://www.portalesmedicos.com/publicaciones/articulos/874/1/Letalidad-por-Infarto-Agudo-del-Miocardio.html>
2. García FA, Gálvez GAM, Castillo GA. Costo institucional del infarto agudo del miocardio en el Instituto de Cardiología y Cirugía Cardiovascular. Rev Cub Salud Pub 2008; 34 (4). [Citado 5 de junio 2010]. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/scielo.php>
3. Anuario Estadístico de Salud de Cuba 2010. La Habana, Cuba: Dirección Nacional de Registros Médicos y Estadísticas de la Salud, 2011.
4. Quirós JJ, Villanueva HL, García BD. Mioglobina/CK-MB: un método de diagnóstico rápido en el infarto agudo de miocardio. Instituto de Cardiología y Cirugía Cardiovascular. Rev Cub Cardiol Cir Cardiovasc 1999; 13 (1): 40-45.
5. López SJ, López dSE. Nuevos criterios de diagnóstico de infarto de miocardio: orden en el caos. Rev Esp Cardiol 2001; 54 (6): 669-674.
6. López SJ. Troponinas y otros marcadores de daño miocárdico. Mitos y realidades. Rev Esp Cardiol 2003; 56 (1): 16-19.
7. Apple FS, Jesse RL, Newby LK, Wu AHB, Christenson RH. National Academy of Clinical Biochemistry and IFCC Committee for Standardization of Marker Cardiac Damage Laboratory Medicine Guidelines: Analytical issues for biochemical marker of acute syndromes. Circulation 2007; 115: 352-355.
8. Hollander JE. The future of cardiac biomarkers. New concepts and emerging technologies for emergency physicians. EMCREG 2005; 4: 1-6.
9. Baum H, Booksteegerris P, Steinbeck G, Neumeier D. A rapid assay for the quantification of myoglobin: Evaluation and diagnostic-relevance in the diagnosis of acute myocardial infarction. Eur J Clin Chem Biochem 1994; 32: 853-858.

10. Lott J, Heinz JW, Reger KA. Time Changes of creatinine kinase and creatinine kinase-MB. Isoenzyme *versus* discrimination values in the diagnosis of acute myocardial infarction. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1995; 33 (8): 491.
11. Altman DG. *Practical statistics for medical research*. New York: Chapman and Hall, 1991.
12. Sanz GA. Estratificación del riesgo en los síndromes coronarios agudos: un problema no resuelto. *Rev Esp Cardiol* 2007; 60 (3): 23-30.
13. Altman DG, Bland JM. *Statistics Notes: Diagnostic tests 1: sensitivity and specificity*. *BMJ* 1994; 308: 1552.
14. Higa C. Poder pronóstico precoz de la mioglobina en los síndromes coronarios agudos sin elevación del segmento ST. *Rev Argent Cardio* 2005; 73(3): 185-191.
15. Luscher MS, Ravkilde J, Thygesen K. Clinical application of two novel rapid bedside tests for the detection of cardiac troponin T and creatine kinase-Mb mass/myoglobin in whole blood in acute myocardial infarction. *Cardiology* 2005; 89: 222-228.
16. Eggers KM, Oldgren J, Nordenskjöld A, Lindahl B. Diagnostic value of serial measurement of cardiac markers in patients with chest pain: Limited value of adding myoglobin to troponin I for exclusion of myocardial infarction. *Am Heart J* 2004; 148 (4): 574-581.
17. Winter R J, Koster WR, Sturk A, Sanders GT. Value of myoglobin, troponin T, and CK-MB mass in ruling out an acute myocardial infarction in the Emergency Room *Circulation* 1995; 92: 3401-3407.
18. Murphy MJ, Berding CB. Use of measurements of myoglobin and cardiac troponins in the diagnosis of acute myocardial infarction. *Crit Care Nurse* 1999; 19 (1): 58-66.
19. Sallach SM, Nowak R, Hudson MP, Tokarski G, Khoury N, Tomlanovich MC et al. Change in serum myoglobin to detect acute myocardial infarction in patients with normal troponin I levels. *Am J Cardiol* 2004; 94 (7): 864-867.
20. Lemos JA, Morrow DA, Gibson CM, Murphy SA, Sabatine MS, Rifai N et al. The prognostic value of serum myoglobin in patients with non-ST-segment elevation acute coronary syndromes. Results from the TIMI 11B and TACTICS-TIMI 18 studies. *J Am Coll Cardiol* 2002; 40: 238-244.
21. Seino Y. Use of a whole blood rapid panel test for heart-type fatty acid-binding protein in patients with acute chest pain: comparison with rapid troponin T and myoglobin tests. *Am J Med* 2003; 115 (3): 185-190.
22. Dagnone E, Collier C, Pickett W, Ali N, Miller M, Tod D et al. Chest pain with nondiagnostic electrocardiogram in the emergency department: a randomized controlled trial of two cardiac marker regimens. *CMAJ* 2000; 162 (1). [Citado 15 de marzo 2011]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1231335/>
23. Chapelle JP, Heusghem C. Semi-quantitative estimation of serum myoglobin by a rapid latex agglutination method: an emergency screening test for acute myocardial infarction. *Clin Chim Acta* 2005; 145: 143-150.
24. Menéndez JM. Mioglobina-látex: un marcador rápido y temprano en el infarto agudo del miocardio *Rev Med Clin* 1991; 99 (6). [Citado 23 de marzo 2010]. Disponible en <http://www.sepeap.es/Hemeroteca/EDUKINA/Artikulu/.../M0990604.pdf>
25. Panteghini M, Cuccia C, Pagani F, Turla C. Comparison of the diagnostic performance of two rapid bedside biochemical assays in the early detection of 44 acute myocardial infarction. *Clin Cardiol* 2003; 6: 394-398.
26. Newby LK, Storrow AB, Gibler WB, Garvey JL, Tucker JF, Kaplan AL. Bedside multimarker testing for risk stratification in chestpain units: The chest pain evaluation by creatine kinase-MB, myoglobin, and troponin I (CHECKMATE) study. *Circulation* 2002; 103: 1832-1837.
27. Santaló MB. Rendimiento diagnóstico y pronóstico del ECG y los nuevos marcadores bioquímicos de necrosis miocárdica en pacientes con dolor torácico y sospecha de síndrome coronario agudo sin elevación del segmento ST. Eficacia de una vía rápida para el diagnóstico del infarto agudo del miocardio. *Facultat de Medicina. Universitat Autònoma de Barcelona. España*. [Citado 4 de marzo 2011]. Disponible en URL: <http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/4443/msb1de1.pdf?sequence=1>
28. Young GP, Murthi P, Levitt MA, Gawad Y. Serial use of bedside CKMB/myoglobin device to detect acute myocardial infarction in emergency department chest pain patients. *J Emerg Med* 2002; 17(5): 769-775.

Inflamación subclínica en 18,310 donadores de sangre fumadores y no fumadores: la cuenta de leucocitos de sangre periférica como marcador de inflamación

Palabras clave: Inflamación subclínica, tabaquismo, enfermedad cardiovascular, factores de riesgo cardiovascular.

Key words: Subclinical inflammation, smoking, cardiovascular disease, cardiovascular risk factors.

Recibido: 28/05/2012
Aceptado: 05/07/2012

Este artículo puede ser consultado en versión completa en:
www.medigraphic.com/patologiaclinica

Marco Aurelio Vences-Avilés,*
Lucía Gama-Valdez**

* Banco de sangre, Unidad Médica de Alta Especialidad Bajío. Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS). León, Guanajuato.

** Unidad de Medicina Familiar Número 47. IMSS. León, Guanajuato.

Correspondencia:
Dr. Marco Aurelio Vences Avilés
Aguiles Serdán 428, Col. Obregón,
37320. León, Guanajuato.
Tel: 477 7165888.
E-mail: mvences@live.com.mx

33

Resumen

Antecedentes: El tabaquismo se ha asociado con inflamación sistémica de bajo grado, un factor de riesgo conocido de enfermedad cardiovascular. Este estado es reflejado por una cuenta elevada de leucocitos de sangre periférica (LSP). **Objetivo:** Analizar la relación entre tabaquismo y la cuenta de LSP en hombres y mujeres, donadores de sangre de varios grupos de edad y analizar la relación de la cuenta LSP con otros factores de riesgo para enfermedad cardiovascular tradicionales. **Material y métodos:** Estudio transversal prospectivo en 15,601 hombres y 2,709 mujeres de 18 a 65 años de edad. Los datos analizados fueron estado e intensidad del tabaquismo, otros factores de riesgo conocidos de enfermedad cardiovascular y cuenta de LSP. **Resultados:** 350 mujeres (12.9%) y 5,091 (32.6%) hombres fueron fumadores. En ambos géneros, la cuenta media de LSP/mm³ fue mayor en fumadores que en no fumadores ($p = 0.001$). La cuenta de LSP se conserva elevada en fumadores de todos los grupos de edad desde los 18 a los 65 años. El análisis de la varianza mostró diferencias

Abstract

Background: Smoking has been associated with low-grade systemic inflammation, a known risk factor for cardiovascular disease (CVRF). This state is reflected in elevated white blood cell count (WBC). **Objective.:** Analyze the relationship between smoking and WBC in blood donors, men and women, of several age groups and analyze the relationship between WBC and others traditional cardiovascular risk factors. **Material and methods:** Prospective cross-sectional study in 15,601 men and 2,709 women aged between 18 and 65 years. Data analyzed were smoking state and smoking intensity, other cardiovascular risk factors and WBC count. **Results:** 350 women (12.9%) and 5,091 (32.6%) men were smokers. In both genders, the average count of WBC/mm³ was higher in smokers than in nonsmokers ($p = 0.001$). WBC remains high in smokers of all age groups, from 18 to 65 years. Analysis of variance showed significant differences in WBC count according to the smoking intensity: nonsmoking *versus* smoking 1-4 cigarettes/day or ≥ 5 years smoking duration *versus* smoking

significativas en la cuenta de LSP de acuerdo con la intensidad del tabaquismo: sin tabaquismo *versus* tabaquismo 1-4 cigarrillos/día o durante menos de cinco años *versus* tabaquismo \geq 5 cigarrillos/días durante \geq 5 años en hombres y mujeres ($p = 0.001$). Otros factores de riesgo conocidos de enfermedad cardiovascular tradicionales también se asocian biviariamente al incremento de LSP. **Conclusiones:** El tabaquismo se asocia a un incremento de LSP, el cual permanece significativo en todos los grupos de edad estudiados y en ambos géneros. Existe un efecto dosis-respuesta entre intensidad del tabaquismo y LSP.

\geq 5 cigarettes/day for \geq 5 years in men and women ($p = 0.001$). In bivariate analyses, others traditional cardiovascular risk factors are also associated to increased WBC count. **Conclusions:** Smoking was associated with elevated WBC, which remains significant in all age groups studied and in both genders. We found that a dose-response relationship exist between smoking intensity and WBC count.

Introducción

En el año 2008, cerca de dos terceras partes del total de muertes en el ámbito global (36 millones), fueron causadas por enfermedades crónicas no transmisibles, principalmente cardiovasculares (48%), cáncer (21%), enfermedades respiratorias crónicas (12%) y diabetes (3%).¹ Los principales factores de riesgo comunes que causan las enfermedades crónicas no transmisibles son el consumo de tabaco, una dieta malsana, la inactividad física y el abuso del alcohol. Un poco más de 1,000 millones de personas fuman tabaco en todo el mundo; su consumo causa una de cada seis muertes por enfermedades crónicas y es factor de riesgo de seis de las ocho principales causas de mortalidad en el mundo.² La Encuesta Global de Tabaquismo en Adultos realizada en México en el año 2009³ refiere que 15.9% (10.9 millones) de los adultos en México son fumadores actuales, 24.8% hombres (8.1 millones) y 7.8% (2.8 millones) mujeres.

La arteriosclerosis es una enfermedad inflamatoria crónica iniciada por la lesión endotelial y definida por la carga de la pared arterial con el colesterol libre y esterificado, seguido por el reclutamiento subintimal focal de monocitos circulantes y linfocitos T que sana por fibrosis y calcificación.⁴ La inflamación desempeña un papel crucial en la aterogénesis, ya sea por los mecanismos locales celulares o las consecuencias humorales fácilmente medibles en el plasma. Este hecho ha generado un gran interés en la identificación de

los marcadores que pueden ser detectados en la sangre que podrían reflejar el estado de la inflamación subyacente presente en la pared vascular. La cascada biológica de eventos que comprenden las defensas naturales del cuerpo contra el daño o la infección es una parte vital del sistema inmunológico. Por lo general, este proceso es una respuesta aguda que da lugar a un rápido incremento en los mediadores inflamatorios que se liberan a la circulación. Por ejemplo, las concentraciones en sangre de la proteína de fase aguda, proteína C reactiva (PCR), pueden aumentar más de 1,000 veces en respuesta a infección o trauma. Sin embargo, varios estudios ahora proporcionan datos convincentes de que elevaciones persistentes, pero muy leves, en los biomarcadores de inflamación sistémica, incluso cuando están dentro del rango clínicamente normal, son factores potenciales de riesgo de varias condiciones adversas para la salud, en particular las enfermedades cardiovasculares.⁵ Estos «reactantes de fase aguda» se han estudiado como posibles marcadores de alteraciones sistémicas más sutiles y persistentes que pueden ser llamadas inflamaciones de bajo grado. Las concentraciones de estos factores circulantes muestran persistencia año con año en un mismo individuo al igual que algunos de los factores de riesgo ampliamente estudiados, tales como la concentración de colesterol en la sangre y la presión sanguínea.^{6,7} Desde hace algunas décadas se conocen los cambios que el tabaquismo provoca en los procesos inmunes e inflamatorios,⁸ así como el papel que

tiene la inflamación con el riesgo de enfermedad cardiovascular.⁹ La contribución de la inflamación a la iniciación y progresión de la arterioesclerosis está recibiendo cada vez mayor atención. Varios reactantes de fase aguda, citocinas y moléculas solubles de adhesión celular se han implicado en este proceso, con sus concentraciones plasmáticas incrementadas en una variedad de enfermedades arterioescleróticas. La inflamación de bajo grado puede ser evaluada usando una variedad de biomarcadores, entre ellos la proteína C reactiva de alta sensibilidad (PCRas) y la cuenta de leucocitos de sangre periférica (LSP); este último, ampliamente disponible, no muy caro y bien estandarizado. Se conoce desde la década de los 70 que el hábito de fumar incrementa la cuenta de LSP.¹⁰⁻¹² Además, se ha investigado el papel predictor que tiene la inflamación subclínica en enfermedades metabólicas y cardiovasculares,^{13,14} específicamente, el papel predictor independiente de la cuenta de LSP en eventos cardiovasculares y mortalidad después de ajustar para otras posibles variables de confusión.^{15,16}

Para confirmar si el tabaquismo conduce a un estado de inflamación sistémica, realizamos el presente estudio en el que se analiza la cuenta de LSP en donadores de sangre aparentemente sanos, hombres y mujeres, fumadores y no fumadores, de varios rangos de edad; además, se analiza el efecto dosis-respuesta respecto a la intensidad del tabaquismo (duración del tabaquismo y el número de cigarrillos/día) y la cuenta de LSP. Los donadores de sangre son un grupo de la población, generalmente jóvenes, que entran en contacto con el sistema de salud y este hecho representa una oportunidad para la detección de riesgos que comprometan su salud en un futuro. Nuestra legislación actual requiere que las personas que donan sangre se encuentren libres de enfermedades agudas como los procesos infecciosos agudos; por lo tanto, se asegura que al momento de la donación y la toma de las muestras sanguíneas los donadores de sangre se encuentren aparentemente sanos.

Material y Métodos

Diseño del estudio y pacientes. Estudio observacional, transversal prospectivo. El Comité de Ética e Investigación del hospital revisó y aprobó el protocolo de investigación. Todos los pacientes dieron su consentimiento informado antes del estudio.

La muestra en estudio se obtuvo de los donadores de sangre consecutivos que acudieron a donar sangre durante el periodo junio de 2007 a junio de 2012 en el Banco de Sangre de la Unidad Médica de Alta Especialidad Bajío del Instituto Mexicano del Seguro Social. Estos donadores de sangre acuden a la institución como donadores voluntarios de reposición en más de 99% de los casos; el resto son donadores altruistas. Los pacientes elegibles fueron 24,599, sólo se incluyeron 18,310, de los cuales 15,601 fueron hombres y 2,709 mujeres de entre 18 y 65 años de edad. Los donadores incluidos tenían ayuno de al menos ocho horas al momento de la toma de la muestra de sangre para su análisis, no presentaban ningún foco infeccioso (como faringoamigdalitis, gastroenteritis, caries infectada, etcétera) u otra patología aguda al momento del estudio. Solamente se incluyeron los donadores que negaron enfermedades crónicas como diabetes, hipertensión arterial y cardiopatías, uso de medicamentos en los últimos tres días y quienes no practicaron ejercicio ni fumaron en las últimas cuatro horas.

Colección de los datos y variables. Cada sujeto fue entrevistado por el médico del área de selección de donadores, el cual registró la información acerca de variables sociodemográficas, incluidas edad y género, así como las variables de interés del estudio: estado del tabaquismo (presencia o ausencia de tabaquismo, número de cigarrillos fumados al día y años de duración del hábito tabáquico) y cuenta de LSP (número $\times 1,000/\text{mm}^3$). También se registró el peso (kg), la talla (m) y el índice de masa corporal (IMC, calculado como kg/m^2). El peso y la talla fueron obtenidos con la persona en ropa ligera en una báscula con estadímetro; se evaluó la presión arterial

sistólica y diastólica empleando un baumanómetro calibrado, con el paciente en posición sedente, después de al menos cinco minutos de reposo, con el brazo izquierdo a la altura del corazón; la presión fue tomada en dos ocasiones y se calculó el promedio de ambas mediciones.

Para fines de este estudio, se clasificó como variable independiente fija a los grupos formados por el estado sobre tabaquismo (tabaquismo positivo ≥ 1 cigarro/día por al menos el último año y tabaquismo negativo cuando este hábito estuvo ausente; los donadores de sangre ex fumadores fueron excluidos del estudio). La cuenta de LSP en ambos grupos se clasificó como variable aleatoria dependiente. Para comparar el efecto dosis-respuesta entre tabaquismo y número de LSP el primero se clasificó como: 0, si existía ausencia del hábito tabáquico; 1, si el número de cigarrillos fumados/día fue < 5 durante un año o más, o si tenían menos de cinco años de duración del hábito tabáquico de cualquier cantidad de cigarrillos/día fumados, y 2 si el número de cigarrillos fumados/día fue ≥ 5 durante cinco o más años.

Los leucocitos de sangre periférica fueron medidos en una muestra de 5 mL de sangre mezclados con la sal dipotásica del ácido etilendiaminotetraacético (K₂EDTA) que se tomó de la fosa antecubital a cada donador durante la mañana después de al menos ocho horas de ayuno. Se utilizó un mismo equipo automatizado (Abbott Cell-Dyn 3500 Hematology Analyzer) adecuadamente calibrado y con controles diarios de calidad.

Otras variables en el estudio fueron:

IMC en kg/m². Peso normal: $IMC < 25$; sobrepeso: $\geq 25 < 30$; obesidad: $IMC \geq 30$.

Sedentarismo. Menos de 150 minutos/semana de ejercicio recreativo programado en el último año o más.

Presión arterial (en mmHg). TA normal: < 120 para la sistólica y < 80 para la diastólica; prehipertensión arterial (pre-HTA): 120-139 para la sistólica y 80-89 para la diastólica. Hipertensión arterial: ≥ 140 para la sistólica y ≥ 90 para la diastólica.

Antecedentes familiares (en el padre, la madre o ambos) de diabetes mellitus tipo 2 (dm2).

Análisis estadístico. Se verificó la distribución normal de LSP empleando la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Se aplicó la prueba t de Student para la diferencia de medias de LSP en los grupos con y sin tabaquismo; los fumadores y no fumadores fueron estratificados por edad y género. Se utilizó análisis de varianza de un factor para analizar las medias de LSP en los grupos de tabaquismo 0, 1 y 2. Los resultados son expresados como la media (DE) y el intervalo de confianza de 95% (IC_{95%}). Se consideraron como estadísticamente significativos los valores de $p < 0.05$. Los análisis estadísticos fueron realizados empleando el paquete SPSS versión 18 (IBM SPSS software, Chicago, IL, USA).

Resultados

Las medidas sociodemográficas y antropométricas de los donadores de sangre (2,709 mujeres y 15,601 hombres) se muestran en los cuadros I y II de acuerdo con el estado sobre tabaquismo. En mujeres, la edad fue menor, con una media de 31.1 años, en no fumadoras que en fumadoras cuya edad media fue de 32.7 años ($p = 0.003$). En mujeres, no se encontraron diferencias significativas entre fumadoras y no fumadoras respecto a IMC, antecedentes familiares de diabetes mellitus tipo 2, minutos de ejercicio a la semana y proporción de sedentarismo; las presiones sistólica y diastólica fueron mayores en no fumadoras que en fumadoras ($p = 0.001$) y la frecuencia cardiaca fue mayor en no fumadoras que en fumadoras ($p = 0.001$). Se observa una diferencia estadísticamente significativa en la media de LSP entre fumadoras (7,670 células/mm³) y no fumadoras (7,300 células/mm³) ($p = 0.001$).

En hombres, no se observa diferencia significativa en fumadores y no fumadores respecto a la edad, minutos de ejercicio a la semana y proporción de sedentarismo. La presión arterial sistólica, diastólica y la frecuencia cardiaca fueron mayores en no fumadores que en fumadores ($p = 0.001$). La cuenta media de

Cuadro I. Medidas sociodemográficas y antropométricas en donadores de sangre, mujeres.

	<i>Fumadoras</i> (n = 350)	<i>No fumadoras</i> (n = 2,359)	<i>Todas</i> (n = 2,709)	<i>p</i>
Edad (años)	32.7 (10.0)	31.1 (9.1)	31.3 (9.3)	0.003
IMC (kg/m ²)	28.3 (4.9)	28.2 (4.9)	28.2 (5.1)	0.61
TAS (mmHg)	116.7 (15.0)	119.9 (15.7)	119.5 (15.7)	0.001
TAD (mmHg)	75.7 (8.4)	77.4 (9.4)	77.1 (9.3)	0.001
FC (min)	72.8 (9.4)	77.3 (10.9)	76.8 (10.8)	0.001
AHFD2 (%)	186 (53.3)	1,297 (55)	1,483 (54.7)	0.8
Ejercicio (min/sem)	44.5 (93.8)	36.5 (88.8)	37.6 (89.5)	0.12
Sedentarismo (%)	291 (83.2)	2,014 (85.4)	2,305 (85)	0.46
LSP (x1,000/mm ³)	7.67 (1.61)	7.30 (1.60)	7.35 (1.61)	0.001

Abreviaturas: IMC = Índice de masa corporal. TAS = Presión arterial sistólica. TAD = Presión arterial diastólica. FC = Frecuencia cardiaca. AHFD2 = Antecedentes heredofamiliares de diabetes mellitus tipo 2.

Ejercicio (min/sem) = Minutos de ejercicio programado a la semana. LSP = Leucocitos de sangre periférica.

Los valores se refieren a la media y la desviación estándar, excepto los antecedentes heredofamiliares de diabetes mellitus tipo 2 y el sedentarismo que se refieren al número absoluto y al porcentaje.

La comparación de medias se realizó mediante t de Student para grupos independientes y la comparación de proporciones mediante la prueba chi cuadrado.

Cuadro II. Medidas sociodemográficas y antropométricas en donadores de sangre, hombres.

	<i>Fumadores</i> (n = 5,091)	<i>No fumadores</i> (n = 10,510)	<i>Todos</i> (n = 15,601)	<i>p</i>
Edad (años)	32.5 (9.2)	32.5 (9.1)	32.5 (9.2)	0.71
IMC (kg/m ²)	28.0 (4.4)	28.2 (4.3)	28.1 (4.3)	0.03
TAS (mmHg)	123.5 (16.1)	126.6 (16.4)	125.4 (16.4)	0.001
TAD (mmHg)	78.5 (9.6)	80.4 (10.0)	79.8 (9.9)	0.001
FC (min)	69.4 (9.6)	72.3 (10.7)	71.3 (10.4)	0.001
AHFD2 (%)	1,822 (35.8)	3,489 (33.2)	5,311 (34.0)	0.002
Ejercicio (min/sem)	59.4 (106.6)	57.0 (96.3)	58.7 (103.3)	0.17
Sedentarismo (%)	4,322 (84.9)	8,818 (83.9)	13,140 (84.2)	0.1
LSP(x 1,000/mm ³)	7.21 (1.63)	6.73 (1.46)	6.89 (1.53)	0.001

Abreviaturas: IMC = Índice de masa corporal. TAS = Presión arterial sistólica. TAD = Presión arterial diastólica. FC = Frecuencia cardiaca. AHFD2 = Antecedentes heredofamiliares de diabetes mellitus tipo 2. Ejercicio (min/sem) = Minutos de ejercicio programado a la semana. LSP = leucocitos de sangre periférica.

Los valores se refieren a la media y la desviación estándar, excepto los antecedentes heredofamiliares de diabetes mellitus tipo 2 y el sedentarismo que se refieren al número absoluto y al porcentaje. n: Número de sujetos.

La comparación de medias se realizó mediante t de Student para grupos independientes y la comparación de proporciones mediante la prueba chi cuadrado.

LSP fue mayor en fumadores (7,210 células/mm³) que en no fumadores (6,730 células/mm³). fue cercana a 30% (5,441 fumadores de 18,310) (cuadro III).

En todos los grupos de edad considerados, la cuenta media de LSP fue significativamente mayor en fumadores que en no fumadores (cuadro III). La proporción de fumadores en el grupo de estudio considerando hombres y mujeres juntos

El análisis de la varianza de un factor muestra que existe un efecto dosis-respuesta respecto a intensidad del tabaquismo (cigarros/día fumados y años con el hábito tabáquico) y la cuenta de LSP (figuras 1 y 2). Para mujeres (figura 1), la

media ($IC_{95\%}$) de LSP/mm³ para los grupos 0, 1 y 2 fueron, respectivamente, 7.300 (7.240-7.370), 7.610 (7.420-7.790) y 7.950 (7.510-8.390), $F = 8.87$ ($p < 0.001$). La prueba *post hoc* de Bonferroni evidencia que las diferencias significativas ocurren entre los grupos 0 y 1 ($p = 0.008$), 0 y 2 ($p = 0.006$) y no se muestra diferencia entre los grupos 1 y 2 ($p = 0.39$). Para hombres (*figura 2*), la media e $IC_{95\%}$ de LSP/mm³ para los grupos 0, 1 y 2 fueron, respectivamente, 6.730 (6.700-6.760), 7.000 (6.960-7.050) y 7.720 (7.630-7.810), $F = 296.2$ ($p < 0.001$). La prueba *post hoc* de Bonferroni evidencia que las diferencias significativas ocurren entre los grupos 0 y 1 ($p = 0.001$), 0 y 2 ($p = 0.001$) y 1 y 2 ($P = 0.001$).

Además del tabaquismo, otros tres factores de riesgo tradicionales para enfermedades cardiovasculares fueron analizados en el presente estudio (*cuadro IV*). Tanto la obesidad como el sedentarismo y la hipertensión arterial contribuyen a la elevación de LSP; la cuenta de LSP fue mayor en 700 células/mm³ en sujetos obesos respecto a sujetos con peso normal; los sujetos sedentarios tienen 320 células/mm³ más respecto a los que realizan ejercicio programado ≥ 150 minutos/semana ($p = 0.001$), y las personas hipertensas muestran un incremento de 450 células/mm³ respecto a las normotensas ($p = 0.001$) (*cuadro IV*).

Discusión

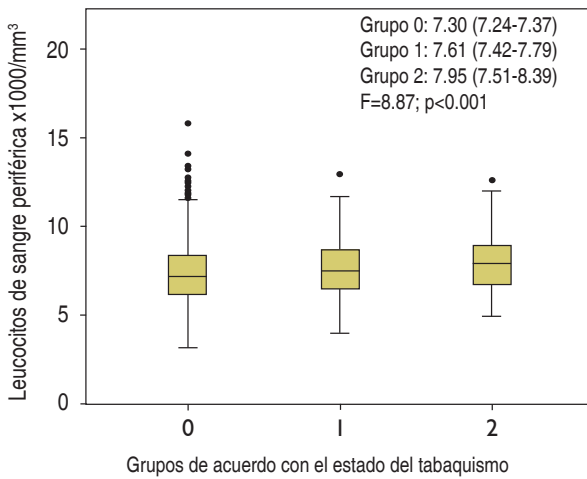
Este estudio aporta información clara sobre que la cuenta de LSP se eleva con el tabaquismo en una población sana de donadores de sangre. Los LSP estuvieron más elevados en fumadores por 450 células/mm³ a través de los rangos de edad incluidos hasta la edad de 54 años; el incremento de leucocitos fue progresivo a través de los rangos de edad, hasta la edad de 54 años, en los sujetos fumadores; no se observa este incremento progresivo en sujetos no fumadores en quienes la cifra tiende a disminuir a través de la edad.

La relación entre tabaquismo y LSP también ha sido reportada previamente.^{10,17,18} Smith y colaboradores¹⁷ reportan un incremento en 1,600 LSP/mm³ en fumadores hombres respecto a no fumadores ajustado para edad e IMC; para mujeres el incremento de LSP observado fue de 1,200/mm³. Recientemente, Fiz y asociados¹⁸ evidencian un incremento de LSP en fumadores y este aumento se asocia con la función pulmonar evaluada por espirometría; también encuentran que el incremento de leucocitos en fumadores se conserva a través de un amplio rango de edades. La cuenta elevada de LSP juega un papel muy importante en el proceso que conduce a enfermedad cardiovascular e incrementa el riesgo de muerte. Ernst y su grupo¹⁹ señalan que el riesgo de infarto agudo del miocar-

Cuadro III. Cuenta de leucocitos de sangre periférica ($\times 1,000/\text{mm}^3$) en donadores de sangre de acuerdo con grupos de edad y estado del tabaquismo.

Edad (años)	Fumadores (n = 5,441)	No fumadores (n = 12,869)	Todos (n = 18,310)	p
18-24	7.11 (1.55)	6.92 (1.54)	6.97 (1.94)	0.001
25-34	7.21 (1.59)	6.88 (1.50)	6.97 (1.54)	0.001
35-44	7.39 (1.72)	6.78 (1.50)	6.95 (1.59)	0.001
45-54	7.39 (1.70)	6.67 (1.46)	6.91 (1.58)	0.001
55-65	7.03 (1.56)	6.63 (1.30)	6.76 (1.40)	0.01

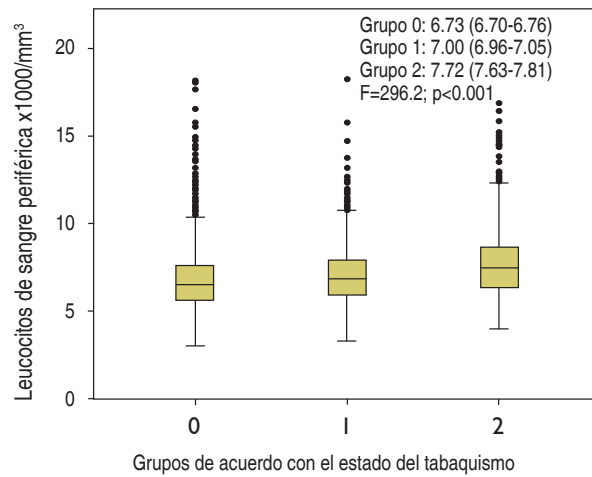
Los valores se refieren a la media y la desviación estándar. La comparación de las medias de leucocitos de sangre periférica se realizó mediante la prueba t de Student para grupos independientes.



- Grupo 0: Sin tabaquismo actual ni en el pasado.
- Grupo 1: Con tabaquismo de 1-4 cigarros/día durante un año o más, o menos de cinco años de duración del hábito tabáquico de cualquier cantidad de cigarros/día fumados.
- Grupo 2: Con tabaquismo ≥ 5 cigarros/día ≥ 5 años de duración.
- La gráfica de caja representa la mediana y los cuartiles.
- Los puntos negros representan valores atípicos dentro de cada grupo.
- Los valores en el recuadro se refieren a la media y los intervalos de confianza de 95% (IC_{95%}).

Figura 1. Leucocitos de sangre periférica de acuerdo con la intensidad del tabaquismo en mujeres.

dio es aproximadamente cuatro veces mayor en personas con cuenta elevada de LSP, pero dentro del rango de lo normal, y que tal valor predictivo es plausible a causa de que los leucocitos contribuyen a las propiedades reológicas de la sangre y participan en el daño endotelial agudo y crónico por la adhesión al endotelio. Ahora existen evidencias de que la arterioesclerosis, la principal causa de enfermedad arterial coronaria, es una enfermedad inflamatoria en la cual los mecanismos inmunes interactúan con los factores de riesgo metabólicos para iniciar, propagar y activar lesiones en el árbol arterial.²⁰ En un estudio prospectivo de seis años de seguimiento de 72,242 mujeres postmenopáusicas,¹⁵ las que se encontraban en el cuartil superior de LSP (6,700-15,000/mm³) comparado con las mujeres en el primer cuartil (2,500- 4,700/mm³) tuvieron el doble de riesgo de enfermedad cardiovascular; también tuvieron 40% de más alto



- Grupo 0: Sin tabaquismo actual ni en el pasado
- Grupo 1: Con tabaquismo de 1 a 4 cigarros/día durante un año o más, o menos de cinco años de duración del hábito tabáquico de cualquier cantidad de cigarros/día fumados.
- Grupo 2: Con tabaquismo ≥ 5 cigarros/día ≥ 5 años de duración.
- La gráfica de caja representa la mediana y los cuartiles.
- Los puntos negros representan valores atípicos dentro de cada grupo.
- Los valores en el recuadro se refieren a la media y los intervalos de confianza de 95% (IC_{95%}).

Figura 2. Leucocitos de sangre periférica de acuerdo con la intensidad del tabaquismo en hombres.

riesgo para infarto del miocardio no fatal, 46% de mayor riesgo para enfermedad cerebrovascular y 50% de mayor riesgo de mortalidad total. Concluyen también que una cuenta del LSP mayor de 6,700/mm³ puede detectar individuos de alto riesgo que no son actualmente identificados por los factores tradicionales de riesgo cardiovascular. En un estudio prospectivo de 9.6 años de seguimiento a 6,756 residentes japoneses, Tamakoshi y colaboradores¹⁶ encuentran una asociación gradual entre la cuenta de LSP y mortalidad por todas las causas (LSP 9,000-10,000 células/mm³ versus LSP 4,000-4,900; RR = 1.61, IC_{95%} 1.07-2.40), así como mortalidad cardiovascular (LSP 9,000-10,000 células/mm³ versus LSP 4,000-4,900; RR = 1.79, IC_{95%} 0.97-3.71). Estudios prospectivos también unen los biomarcadores de inflamación con el riesgo de cáncer. En uno de estos estudios se analiza si la cuenta de LSP tiene asociación independiente

con la incidencia de cáncer en 173,748 mujeres postmenopáusicas de 50-79 años de edad;¹⁵ encontraron una asociación gradual de la cuenta de LSP con la incidencia de cáncer de mama, colorrectal, endometrial y pulmonar. Las asociaciones entre LSP y cáncer de mama y endometrial se conservaron como significativas cuando los análisis se limitaron a no fumadores con elevación de LSP. Shankar y asociados,²¹ en un estudio con un modelo de riesgo proporcional ajustado para otras variables, estimaron que el riesgo de mortalidad por cáncer de varios tipos comparando el cuartil 4 de la cuenta de LSP ($\geq 7,400$ células/mm³) con el cuartil I ($\leq 5,300$ células/mm³) fue 1.73 (IC_{95%} 1.18-2.55).

En nuestro estudio, la cuenta de LSP fue mayor en fumadores que en no fumadores en todos los grupos de edad analizados; las diferencias de medias de LSP observadas fueron 190, 330, 610, 720 y 400 células/mm³ a favor de fumadores frente a los no fumadores para los grupos de edad 18-24, 25-34, 35-44, 45-54 y 55-65 años, respectivamente (*cuadro III*). Un patrón similar fue observado en el estudio de Fiz y colaboradores¹⁸ al analizar la cuenta de LSP en 222,841 empleados sanos, fumadores y no fumadores, con un incremento medio de 593 células/mm³ en fumadores respecto a no fumadores de un grupo de edad al siguiente; los grupos de edad en este caso fueron equiparables a los de nuestro estudio.

Los resultados demuestran también un efecto de la dosis del tabaquismo sobre la cuenta de LSP (*figuras 1 y 2*). En el análisis se consideraron tres grupos fijos de acuerdo con la intensidad del tabaquismo, las diferencias medias de LSP son significativas entre los sujetos sin tabaquismo actual ni en el pasado (grupo 0) *versus* tabaquismo actual de 5 o más cigarrillos/día durante cinco o más años, con incrementos en fumadores respecto a no fumadores de 650 células/mm³ en el grupo de mujeres y 990 células/mm³ en hombres. Schwartz y Weiss²² han reportado un efecto dosis-respuesta entre tabaquismo y LSP en un grupo de 8,635 sujetos en un programa sobre vigilancia de la salud; concluyen que entre fumadores actuales se observa

una relación dosis-respuesta para cigarrillos/día y paquetes fumados al año. En un estudio más reciente, Asthana y su grupo,²³ al estudiar una cohorte de fumadores activos, reportaron que la intensidad del tabaquismo, evaluada a través de cigarrillos/día, paquetes/año, prueba de dependencia a la nicotina de Fargerström y niveles de monóxido de carbono, está asociada con el incremento de LSP.

El análisis bivariado de nuestros datos también muestra que otros factores se asocian a incrementos en la cuenta de LSP. La obesidad, el sedentarismo y la hipertensión arterial se asociaron significativamente a un incremento de LSP (*cuadro IV*). Estos tres factores tradicionales de riesgo cardiovascular y metabólico se han asociado a un incremento en los marcadores de inflamación.²⁴⁻²⁸ En otro estudio,²⁴ el tiempo de actividad física se asoció positivamente con la concentración de albúmina sérica e inversamente con la concentración de fibrinógeno y la cuenta de leucocitos. Se ha supuesto que el ejercicio, a través de la disminución de la inflamación subclínica, contribuye a la

Cuadro IV. Valores medios de leucocitos de sangre periférica y otros factores tradicionales de riesgo cardiovascular en donadores de sangre aparentemente sanos.

IMC	LSP	Estadístico de prueba	p
Normal (n = 4,633)	6.63 (1.51)	F = 284.3	0.001
Sobrepeso (n = 8,038)	6.88 (1.51)		
Obesidad (n = 5,639)	7.33 (1.57)		
Sedentarismo			
Presente (n = 15,498)	7.01 (1.56)	t = 10.0	0.001
Ausente (n = 2,812)	6.69 (1.48)		
Presión arterial			
Normal (n = 7,062)	6.85 (1.56)	F = 60.6	0.001
Pre-HTA (n = 9,446)	6.97 (1.52)		
HTA (n = 1,802)	7.3 (1.67)		

Abreviaturas: LSP = Leucocitos de sangre periférica. IMC = índice de masa corporal. Pre-HTA = Prehipertensión arterial. HTA = Hipertensión arterial. F: Estadístico de prueba para el análisis de la varianza de un factor. t: estadístico de la prueba t de Student. Los valores de leucocitos de sangre periférica (LSP) se refieren a la media y la desviación estándar.

protección contra la aparición de enfermedades metabólicas, cardiovasculares y cáncer.²⁴ Por otra parte, el peso corporal y los cambios que se suceden en él mediante ejercicio físico pueden disminuir favorablemente los marcadores de inflamación.^{27,28} En nuestra opinión, el incremento de LSP en el grupo de donadores de sangre con factores tradicionales de riesgo cardiovascular puede conducir a alteraciones vasculares difusas y a procesos arterioescleróticos progresivos que, sin duda, contribuyen a la aparición de problemas metabólicos y cardiovasculares en el futuro; el control adecuado de la inflamación y las medidas específicas para cada uno de los factores de riesgo podrán prevenir los problemas derivados de la inflamación vascular. Tani y asociados,²⁹ en un estudio reciente de seis meses de seguimiento a pacientes con enfermedad arterial coronaria, logran una disminución significativa de la placa de 12.9% con pravastatina y ejercicio. Este mismo autor, pero en otro estudio,³⁰ logra la regresión de placas arterioescleróticas y la disminución simultánea de células inflamatorias mediante terapia con estatinas. En este estudio, los autores concluyen que la cuenta de monocitos puede, especialmente, servir como un marcador simple de regresión de la placa durante tratamiento con estatinas.

En nuestro estudio no se investigó, mediante análisis multivariado, la contribución independiente de cada uno de los factores tradicionales de riesgo cardiovascular sobre LSP y otros marcadores de inflamación. Evaluamos la cantidad total de LSP mediante un contador hematológico automatizado, pero determinaciones más específicas podrían realizarse con citometría de flujo para clúster de diferenciación (CD) e investigar el tipo específico de leucocito que se incrementa en cada caso. La principal fortaleza de nuestro estudio reside en el gran tamaño de la muestra que incluyó donadores de sangre de un amplio rango de edad, aparentemente sanos y de los que se dispuso prospectivamente de información confiable acerca de su hábito tabáquico y otro tipo de variables.

Conclusiones

El tabaquismo se asocia a un incremento de LSP. Este incremento permanece significativo a través de todos los grupos de edad estudiados y en ambos géneros. Existe un efecto dosis-respuesta entre intensidad del tabaquismo y LSP. Es necesario analizar las interacciones que pudieran existir entre tabaquismo y otros factores de riesgo cardiovascular tradicionales debido a que obesidad, hipertensión arterial y sedentarismo también presentaron asociación bivariada con la cuenta de LSP.

Referencias

1. World Health Organization. Global status report on noncommunicable diseases. Geneva: WHO; 2011.
2. World Health Organization. Report on the global tobacco epidemic, 2008: the MPOWER package. Geneva: WHO. ISBN: 978 92 4 159628 2. [junio 20]. Available in: http://www.who.int/tobacco/mpower/gtcr_download/en/index.html (Access: June, 20th 2012).
3. Organización Panamericana de la Salud; Instituto Nacional de Salud Pública (MX). Encuesta Global de Tabaquismo en Adultos. México 2009. Cuernavaca, México: INSP/OPS; 2010. Disponible en: www.who.int/tobacco/surveillance/gats_rep-mexico.pdf
4. Balanescu S, Calmac L, Constantinescu D, Marinescu M, Onut R et al. Systemic inflammation and early atheroma formation: Are they related? *Maedica (Buchar)* 2010; 5 (4): 292-301.
5. Nicklas BJ, Brinkley TE. Exercise training as a treatment for chronic inflammation in the elderly. *Exerc Sport Sci Rev* 2009; 37 (4): 165-70.
6. Danesh J, Collins R, Appleby P, Peto R. Fibrinogen, C-reactive protein, albumin or white cell count: Meta-analyses of prospective studies of coronary heart disease. *JAMA* 1998; 279: 1477-1482.
7. Ridker PM, Rifai N, Pfeffer MA, Sacks FM, Braunwald E. Long-term effects of pravastatin on plasma concentration of C-reactive protein. *Circulation* 1999; 100: 230-235.
8. Holt PG. Immune and inflammatory function in cigarette smokers. *Thorax* 1987; 42 (4): 241-249.
9. Tracy RP, Psaty BM, Macy E, Bovill EG, Cushman M et al. Lifetime smoking exposure affects the association of C-reactive protein with cardiovascular disease risk factors and subclinical disease in healthy elderly subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17 (10): 2167-2176.
10. Noble RC, Penny BB. Comparison of leukocyte count and function in smoking and nonsmoking young men. *Infect Immun* 1975; 12 (3): 550-555.
11. Burney SW, Bonus L. Cross-sectional assessment of laboratory variables in a healthy male population. II. Cigarette smoking and laboratory values. *Aging Hum Dev* 1972; 3: 89-94.
12. Corre F, Lellouch J, Schwartz D. Smoking and leukocyte counts. Results of an epidemiologic study. *Lancet* 1971; 2: 632-634.
13. Danesh J, Collins R, Appleby P, Peto R. Association of fibrinogen, C-reactive protein, albumin, or leukocyte count with coronary heart disease: Meta-analyses of prospective studies. *JAMA* 1998; 279 (18): 1477-1482.

14. Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, Anderson JL, Cannon RO et al. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: A statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation* 2003; 107 (3): 499-511.
15. Margolis KL, Manson JE, Greenland P, Rodabough RJ, Bray PF et al. Women's Health Initiative Research Group. Leukocyte count as a predictor of cardiovascular events and mortality in postmenopausal women: The Women's Health Initiative Observational Study. *Arch Intern Med* 2005; 165 (5): 500-508.
16. Tamakoshi K, Toyoshima H, Yatsuya H, Matsushita K, Okamura T et al. NIPPON DATA90 Research Group. White blood cell count and risk of all-cause and cardiovascular mortality in nationwide sample of Japanese-results from the NIPPON DATA90. *Circ* 2007; 71 (4): 479-485.
17. Smith MR, Kinmonth AL, Luben RN, Bingham S, Day NE et al. Smoking status and differential white cell count in men and women in the EPIC-Norfolk population. *Atherosclerosis* 2003; 169 (2): 331-337.
18. Fiz JA, Morera J, Monsonis JV, Calvo A, Vazquez A, Espinal A et al. Systemic inflammation in 222.841 healthy employed smokers and nonsmokers: white blood cell count and relationship to spirometry. *Tob Induc Dis* 2012; 10 (1): 7. [Epub ahead of print]
19. Ernst E, Hammerschmidt DE, Bagge U, Matrai A, Dormandy JA. Leukocytes and the risk of ischemic diseases. *JAMA* 1987; 257 (17): 2318-2324.
20. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005; 352: 1685-1695.
21. Shankar A, Wang JJ, Rochtchina E, Yu MC, Kefford R, Mitchell P. Association between circulating white blood cell count and cancer mortality: A population-based cohort study. *Arch Intern Med* 2006; 166 (2): 188-194.
22. Schwartz J, Weiss ST. Host and environmental factors influencing the peripheral blood leukocyte count. *Am J Epidemiol* 1991; 134: 1402-1409.
23. Asthana A, Johnson HM, Piper ME, Fiore MC, Baker TB, Stein JH. Effects of smoking intensity and cessation on inflammatory markers in a large cohort of active smokers. *Am Heart J* 2010; 160 (3): 458-463.
24. Sprague BL, Trentham-Dietz A, Klein BE, Klein R, Cruickshanks KJ et al. Physical activity, white blood cell count, and lung cancer risk in a prospective cohort study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; 17 (10): 2714-2722.
25. Huang ZS, Chien KL, Yang CY, Tsai KS, Wang CH. Peripheral differential leukocyte counts in humans vary with hyperlipidemia, smoking, and body mass index. *Lipids* 2001; 36 (3): 237-245.
26. Moradi S, Kerman SR, Rohani F, Salari F. Association between diabetes complications and leukocyte counts in Iranian patients. *J Inflamm Res* 2012; 5: 7-11.
27. Holz T, Thorand B, Döring A, Schneider A, Meisinger C et al. Markers of inflammation and weight change in middle-aged adults: results from the prospective MONICA/KORA S3/F3 study. *Obesity (Silver Spring)* 2010; 18 (12): 2347-2353.
28. Dietrich M, Jialal I. The effect of weight loss on a stable biomarker of inflammation, C-reactive protein. *Nutr Rev* 2005; 63 (1): 22-28.
29. Tani S, Nagao K, Anazawa T, Kawamata H, Furuya S et al. Coronary plaque regression and lifestyle modification in patients treated with pravastatin. Assessment mainly by daily aerobic exercise and an increase in the serum level of high-density lipoprotein cholesterol. *Circ J* 2010; 74 (5): 954-961.
30. Tani S, Nagao K, Anazawa T, Kawamata H, Furuya S et al. Association of leukocyte subtype counts with coronary atherosclerotic regression following pravastatin treatment. *Am J Cardiol* 2009; 104: 464-469.

Determinación de intervalos de referencia para química clínica en población mexicana

Palabras clave: Intervalo de referencia, química clínica, México.

Key words: Reference intervals, clinical chemistry, México.

Recibido: 10/04/2012

Aceptado: 18/10/2012

Este artículo puede ser consultado en versión completa en:

www.medigraphic.com/patologiaclinica

Gabriela Olay Fuentes,* Pablo Díaz Piedra,** Ricardo Hernández Gómez,*** R Daniel Cervantes-Villagrana,+ José Miguel Presno-Bernal,++ Luz Elena Alcántara Gómez+++

* Departamento de Inmunoquímica, Laboratorio Carpermor.

** Departamento de Hematología, Lab. Carpermor.

*** Responsable de Análisis Estadístico, Laboratorio Carpermor.

+ Departamento de Investigación Clínica, Grupo Diagnóstico Médico Proa (GDMP).

++ Dirección de Proyectos e Investigación, GDMP.

+++ Laboratorio de Bioquímica. Lab. Carpermor.

Correspondencia:

QFB Gabriela Olay Fuentes

Laboratorio Carpermor

Alfonso Herrera 75, Col. San Rafael,

06470, México, D.F.

Tel: 5140-7600 Exts. 52017, 52009

E-mail: gabriela.olay@carpermor.com.mx

Resumen

La interpretación médica de los resultados clínicos es una práctica fundamental en las decisiones clínicas sobre el paciente y, para ello, es necesario comparar los resultados obtenidos frente al intervalo de referencia calculado para la población del paciente. El objetivo de este estudio fue determinar los intervalos de referencia de diferentes analitos de química clínica en la población mexicana. Se analizaron 653,467 resultados de individuos de uno y otro género. Se utilizó el método no paramétrico de Tukey para la detección de valores extremos y se determinaron los intervalos de referencia a través del método no paramétrico recomendado por el CLSI en su guía C28-A3. Se observaron variaciones entre los intervalos de referencia calculados y los referidos en el inserto de diferentes analitos: los metabolitos como nitrógeno ureico y urea; las enzimas como alanina aminotransferasa, gamma glutamil transpeptidasa y lactato deshidrogenasa; y electrolitos como cloro, fósforo y magnesio mostraron intervalos con mayor concentración. Los intervalos de referencia de las pruebas clínicas analizadas, en algunos casos, muestran diferencias respecto a los intervalos sugeridos por el inserto, e incluso pueden diferir de los valores

Abstract

The medical interpretation of clinical results is a fundamental practice in the decision making process respect to patient management, in this process is necessary to compare the result against the reference range calculated for the patient population. The aim of this study was to determine the reference intervals of different clinical chemistry analytes in the Mexican population. Results of 653,467 individuals of both genders were analyzed. We used the nonparametric method of Tukey for detection of extreme values and reference intervals determined by the nonparametric method recommended by the CLSI in C28-A3 guide. Variations were observed between the calculated reference intervals and those submitted in the insert of different analytes: metabolites such as urea and blood urea nitrogen, enzymes as alanine aminotransferase, gamma glutamyl transpeptidase and lactate dehydrogenase, and electrolytes as chlorine, phosphorus and magnesium showed higher concentration intervals. Reference intervals of clinical trials analyzed, in some cases, show differences with respect to the ranges suggested by insert, and can even differ from values suggested by international associations. Therefore, it

sugeridos por asociaciones internacionales. Por lo anterior, es recomendable determinar los intervalos de referencia en cada laboratorio clínico.

Introducción

Los estudios de la química sanguínea son pruebas de rutina ampliamente solicitadas por el clínico y proveen información presuntiva sobre el estado fisiológico del organismo, como es la evaluación de: 1) el adecuado metabolismo de carbohidratos mediante la determinación de glucemia;¹ 2) el diagnóstico de dislipidemias al evaluar el perfil de lípidos (colesterol total, triglicéridos, lipoproteína de alta densidad [HDL], lipoproteína de baja densidad [LDL] e índice aterogénico);² 3) la función pancreática a través de la amilasa y lipasa;³ 4) la función hepática con la determinación de enzimas como aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT), fosfatasa alcalina (ALP) y gamma glutamil transpeptidasa (GGT), y metabolitos como las bilirrubinas, y^{4,5} 5) también permite evaluar la función renal al cuantificar metabolitos como la creatinina y urea,^{6,7} y el equilibrio agua-electrolitos mediante la cuantificación de sodio, potasio y cloro, entre otros.⁸⁻¹⁰

El intervalo de referencia para la mayor parte de las pruebas de laboratorio se define por los valores umbral, entre los cuales caen los resultados de un porcentaje determinado (generalmente 95%) de individuos aparentemente sanos.¹¹ Los intervalos de referencia de los analitos en química clínica tradicionalmente se toman de los insertos que acompañan al reactivo con el que se procesa la prueba; en la mayoría de los casos estos valores corresponden a una población distinta a aquella donde se realizarán las pruebas en un determinado laboratorio con una mezcla étnica diferente a la correspondiente al inserto.¹²

Las variables en los valores de referencia se pueden clasificar en dos tipos: 1) las variables preanalíticas que pueden afectar los resultados del estudio, incluyen la edad, la dieta, el género, el ritmo circadiano, la raza, la postura, los medicamentos,

is advisable to determine reference intervals in each clinical laboratory.

la actividad física, el estado socioeconómico, la historia médica y el ayuno y 2) las variables analíticas establecidas por las diferencias en el procedimiento de prueba o las diferencias en los criterios de interpretación. Estos factores exigen el más alto grado de estandarización de la prueba y evaluación de la calidad.^{11,13} El Instituto de Estándares Clínicos y Laboratorios (*Clinical and Laboratory Standards Institute* o CLSI, por sus siglas en inglés) en su guía C28-A3, recomienda el método no paramétrico en un mínimo de 120 individuos de referencia para determinar los intervalos de referencia en la población en cuestión.^{12,14} El objetivo de este trabajo fue determinar los intervalos de referencia de diferentes analitos de química clínica en la población mexicana que acude al Laboratorio Carpermor a realizar sus estudios.

Material y métodos

Se analizaron 653,467 resultados de química clínica de individuos de uno y otro sexo. Las muestras sanguíneas fueron obtenidas y procesadas durante el mes de abril de 2011 en el Laboratorio Carpermor. De acuerdo con la Ley General de Salud, el estudio no representa un riesgo físico y de confidencialidad, por lo que no requirió la firma de consentimiento de los pacientes. El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética e Investigación del Laboratorio Carpermor.

El suero se obtuvo mediante la centrifugación a 2,500 revoluciones por minuto (rpm) de las muestras de sangre total coagulada y fueron procesadas por fotometría de reflexión en el instrumento Architect C (Abbott Diagnostics) para determinar los distintos analitos. Se analizaron las concentraciones de metabolitos como ácido úrico, bilirrubina directa, bilirrubina indirecta, bilirrubina total, creatinina (CREA), nitrógeno ureico en sangre (BUN), urea

y la relación BUN/CREA; también enzimas como alanina aminotransferasa (ALT), amilasa, aspartato aminotransferasa (AST), gamma glutamil transpeptidasa (GGT), lactato deshidrogenasa (LDH) y las proteínas totales. Además de hierro y electrolitos como calcio, cloro, fósforo, magnesio, potasio y sodio.

Es importante señalar que en este trabajo no se determinaron los límites de referencia para glucosa y el perfil de lípidos que comprende el colesterol, las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y las lipoproteínas de baja densidad (LDL), porque consideramos que es importante seguir las recomendaciones internacionales y nacionales para estos analitos. La Asociación Americana de Diabetes (ADA, por sus siglas en inglés) recomienda que el límite de referencia para glucosa deber ser < 100 mg/dL. Para los límites de referencia de lípidos se siguieron las indicaciones de la Norma para la Prevención, Tratamiento y Control de las Dislipidemias NOM-037-SSA2-2002.

Métodos estadísticos. 1) *Detección de valores extremos.* La detección de valores extremos en cada uno de los subgrupos se realizó usando el método no paramétrico de Tukey. El método consistió en calcular los cuartiles inferior (Q_1 , percentil 25%) y superior (Q_3 , percentil 75%) del conjunto de datos, así como el rango intercuartil (RIC), obtenido de la sustracción, $Q_3 - Q_1$. A continuación, se calcularon los límites superior e inferior de acuerdo con las siguientes fórmulas:

$$\begin{aligned}\text{Límite inferior} &= Q_1 - 1.5 \times \text{RIC} \\ \text{Límite superior} &= Q_3 + 1.5 \times \text{RIC}\end{aligned}$$

Cualquier dato ubicado fuera de cualquiera de los límites se consideró como un valor extremo y no se consideró para la determinación de los intervalos de referencia. Este procedimiento se repitió en cada conjunto de datos hasta anular todos los valores extremos.

2) *Determinación de intervalos de referencia.* La determinación de los intervalos de referencia para

cada subgrupo de datos se realizó haciendo uso del método no paramétrico recomendado por el CLSI en su guía C28-A3. El método consiste en ordenar el número n de observaciones del conjunto de datos por magnitud en orden descendente. Luego, se determinan las observaciones que corresponden a los límites de referencia inferior (percentil 2.5%) y superior (percentil 97.5%) a través de las siguientes expresiones:

$$\begin{aligned}\text{Límite de referencia inferior } (r_1) &= 0.025 \times (n + 1) \\ \text{Límite de referencia superior } (r_2) &= 0.975 \times (n + 1)\end{aligned}$$

Como los valores obtenidos de r_1 y r_2 generalmente no son números enteros, los límites se determinaron por interpolación entre los datos correspondientes a los rangos en cada uno de los límites.

3) *Partición de los intervalos de referencia.* La partición de los intervalos de referencia se determinó de acuerdo con el sistema de intervalos de referencia utilizado en el laboratorio Carpermor (cuadros I, II y III en columna de intervalos del inserto), por lo tanto, se omitió determinar si hay diferencia significativas entre cada partición.

Resultados

Metabolitos analizados. Los intervalos de referencia obtenidos para algunos metabolitos evaluados en química clínica se presentan en el *cuadro I*. Los resultados del ácido úrico muestran intervalos ligeramente diferentes entre los géneros, donde el intervalo para los hombres se encuentra desplazado hacia la derecha a valores de mayor concentración sanguínea; además, los intervalos tienen un rango mayor hacia ambos límites respecto a sus pares referidos en el inserto. Respecto a la bilirrubina directa, indirecta y total, los límites de referencia obtenidos son iguales entre los géneros y son similares a los intervalos del inserto.

Para la creatinina se obtuvieron intervalos de referencia similares para ambos géneros y para sus pares de referencia actuales, con una diferencia

Cuadro I. Intervalos de referencia calculados para algunos analitos productos del metabolismo analizados en suero.

<i>Género</i>	<i>Edad (años)</i>	<i>n</i>	<i>Intervalo calculado</i>	<i>Intervalo del inserto</i>
Ácido úrico (mg/dL)				
Mujeres	Todas	19,568	2.4 - 7.16	2.6 - 6.0
Hombres	Todas	14,881	3.24 - 9.2	3.5 - 7.2
Bilirrubina directa (mg/dL)				
Mujeres	Todas	24,948	0.12 - 0.42	0 - 0.5
Hombres	Todas	24,948	0.12 - 0.42	0 - 0.5
Bilirrubina indirecta (mg/dL)				
Mujeres	Todas	24,742	0.09 - 0.65	0.2 - 0.7
Hombres	Todas	24,742	0.09 - 0.65	0.2 - 0.7
Bilirrubina total (mg/dL)				
Mujeres	Todas	25,663	0.22 - 1.04	0.2 - 1.2
Hombres	Todas	25,663	0.22 - 1.04	0.2 - 1.2
Creatinina (mg/dL)				
Mujeres	Todas	19,067	0.59 - 1.04	0.6 - 1.1
Hombres	Todas	13,681	0.77 - 1.32	0.7 - 1.3
Nitrógeno ureico (mg/dL)				
Mujeres	0 - 49	7,817	5 - 19	7.0 - 18.7
	> 49	6,267	8 - 24	9.8 - 20.1
Hombres	0 - 49	5,284	8 - 21	8.9 - 20.6
	> 49	4,641	9 - 27	8.4 - 25.7
Urea (mg/dL)				
Mujeres	0 - 50	11,180	12.8 - 41	14.9 - 40.0
	> 50	8,140	17.1 - 56	20.9 - 43.0
Hombres	0 - 50	7,959	15 - 43	19.0 - 44.0
	> 50	6,017	19 - 58	17.9 - 54.9
Relación BUN/CREA				
Mujeres	Todas	14,029	8.05 - 26	10 - 20
Hombres	Todas	10,048	8.13 - 22.77	10 - 20

Abreviaturas: BUN = Nitrógeno ureico en sangre; CREA = Creatinina.

< 0.7 unidades en cada uno de los límites. Los intervalos de referencia calculados del nitrógeno ureico en el género femenino son más amplios que los intervalos usados actualmente, sobre todo en la partición de mujeres > 49 años. En el caso del género masculino, el intervalo calculado para la partición de 0-49 años, es más amplio que el intervalo del inserto, mientras que en la partición de hombres > 49 años se recorre a la derecha.

Para la urea se obtuvieron intervalos más amplios entre los géneros y edades en com-

paración con los intervalos de referencia, con una diferencia mayor en la partición del género femenino > 50 años (17.1-56 mg/dL) *versus* el intervalo del inserto (20.9-43 mg/dL). En el caso del género masculino de 0-50 años, el intervalo se encuentra desplazado a la izquierda; mientras que en la partición > 50 años, el intervalo se encuentra desplazado a la derecha del intervalo del inserto. Finalmente, la relación BUN/CREA calculada dio como resultado intervalos más amplios respecto a los usados actualmente en

Cuadro II. Intervalos de referencia calculados para algunas enzimas analizadas en suero.

<i>Género</i>	<i>Edad (años)</i>	<i>n</i>	<i>Intervalo calculado</i>	<i>Intervalo del inserto</i>
ALT (U/L)				
Mujeres	Todas	13,831	7 - 36	5 - 34
Hombres	Todas	9,655	9 - 47	5 - 34
AST (U/L)				
Mujeres	Todas	25,807	12 - 35	5 - 34
Hombres	Todas	25,807	12 - 35	5 - 34
Amilasa (U/L)				
Mujeres	Todas	116	32.8 - 124.4	25 - 125
Hombres	Todas	116	32.8 - 124.4	25 - 125
GGT (U/L)				
Mujeres	Todas	12,834	10 - 50	9 - 36
Hombres	Todas	9,561	13 - 82	12 - 64
Lactato deshidrogenasa (U/L)				
Mujeres	0 - 5	157	147.2 - 397	145 - 395
	6 - 10	126	185.4 - 263	145 - 300
	11 - 15	264	135.5 - 237.3	120 - 235
	16 - 20	515	124 - 222	105 - 235
	> 20	13,939	128 - 249	125 - 243
	Hombres	0 - 5	167	166 - 404.2
6 - 10		166	187.4 - 316.4	155 - 345
11 - 15		248	150 - 282.1	145 - 300
16 - 20		370	133 - 232	105 - 235
> 20		7,747	139 - 205	125 - 243
Proteínas totales (g/dL)				
Mujeres	0 - 3	132	6.1 - 8.2	3.6 - 7.5
	4 - 18	879	6.4 - 8.2	6 - 8
	> 18	14,340	6.2 - 8.1	6.4 - 8.3
Hombres	0 - 3	132	5.9 - 7.5	3.6 - 7.5
	4 - 18	722	6.6 - 8.2	6 - 8
	> 18	9,914	6.5 - 8.1	6.4 - 8.3

Abreviaturas: ALT = Alanina aminotransferasa; AST = Aspartato aminotransferasa; GGT = Gamma glutamil transpeptidasa.

ambos géneros con una diferencia mayor en los valores de los pacientes femeninos.

Analitos enzimáticos y proteínas. Los intervalos de referencia obtenidos para proteínas y enzimas evaluadas en química clínica se presentan en el *cuadro II*. Los intervalos calculados para la enzima ALT se encuentran desplazados hacia la derecha en ambos géneros en comparación con

los intervalos utilizados actualmente, en mujeres se desplaza 2 U/L, pero en hombres hay mayor diferencia con un intervalo calculado de 9-47 U/L *versus* 5-34 U/L del intervalo del inserto. Los valores determinados para la AST son iguales entre los géneros, pero en comparación con los intervalos del inserto, los intervalos calculados son estrechos por el desplazamiento a la derecha del extremo inferior.

Cuadro III. Intervalos de referencia calculados para algunos iones metálicos y electrolitos analizados en suero.

Género	Edad (años)	n	Intervalo calculado	Intervalo del inserto
Calcio (mg/dL)				
Mujeres	0 - 12	394	9.2 - 10.9	7.6 - 10.8
	>12	14,827	8.7 - 10.2	8.4 - 10.2
Hombres	0 - 12	417	9.2 - 10.7	7.6 - 10.8
	>12	10,806	8.7 - 10.3	8.4 - 10.3
Cloro (mmol/L)				
Mujeres	Todas	24,628	102 - 112	98 - 107
Hombres	Todas	24,628	102 - 112	98 - 107
Sodio (mg/dL)				
Mujeres	Todas	25,676	136 - 145	136 - 145
Hombres	Todas	25,676	136 - 145	136 - 145
Potasio (mmol/L)				
Mujeres	Todas	26,121	3.7 - 5.2	3.5 - 5.1
Hombres	Todas	26,121	3.7 - 5.2	3.5 - 5.1
Fósforo (mg/dL)				
Mujeres	Todas	226	2.3 - 6	2.3 - 4.7
Hombres	Todas	226	2.3 - 6	2.3 - 4.7
Magnesio (mg/dL)				
Mujeres	Todas	146	2.07 - 3.33	1.9 - 2.5
Hombres	Todas	146	2.07 - 3.33	1.9 - 2.5
Hierro (µg/dL)				
Mujeres	Todas	15,583	10 - 150	21 - 156
Hombres	Todas	11,016	15 - 167	31 - 144

La amilasa mostró intervalos más estrechos respecto de los valores del inserto, principalmente por el desplazamiento a la derecha de los límites inferiores en el caso de los dos géneros. En los intervalos calculados para la enzima GGT se determinó una amplitud mayor en ambos géneros en comparación del inserto, y esta diferencia ocurre debido al desplazamiento del extremo superior hacia la derecha de los valores del inserto. En el género femenino el intervalo calculado alcanza las 50 U/L *versus* 36 U/L establecidas en el intervalo de comparación, mientras los hombres presentan un extremo superior de 82 U/L *versus* 64 U/L.

En el caso de la enzima lactato deshidrogenasa, los intervalos de referencia obtenidos difieren en la mayoría de las particiones establecidas para ambos

géneros. En pacientes de 0-5 años, el límite superior calculado para los hombres es menor que el de comparación (404.2 y 420 U/L, respectivamente). En los pacientes entre 6 y 10 años, los intervalos para ambos géneros son más estrechos en los dos extremos *versus* los intervalos de comparación (~34.6 U/L). Mientras que los pacientes masculinos > 20 años, presentan un intervalo estrecho (139-205 U/L) *versus* el intervalo de comparación (125-243 U/L).

Por otro lado, las concentraciones séricas de proteínas totales mostraron intervalos calculados muy similares entre géneros y entre los grupos de edad. Los intervalos calculados son estrechos por el desplazamiento del límite inferior hacia la derecha del valor de los intervalos del inserto en los

individuos entre 0 y 3 años de ambos géneros, en mujeres el intervalo de 6.1-8.2 g/dL *versus* 3.6-7.5 g/dL referido en el inserto; mientras que en hombres el intervalo de 5.9-7.5 g/dL *versus* 3.6-7.5 g/dL.

Iones analizados. Los intervalos de referencia obtenidos para algunos iones metálicos y electrolitos evaluados en química clínica se presentan en el *cuadro III*. Los intervalos obtenidos para calcio son similares a pesar del género y la edad. Cuando son comparados con los intervalos de referencia actuales, los individuos con un rango de edad de 0-12 años en ambos géneros difieren en el límite inferior con un desplazamiento a la derecha; mientras tanto, para el grupo mayor de 12 años las diferencias son mínimas.

Los intervalos calculados para el cloro son iguales entre los géneros, pero se recorren ~4.5 mmoles/L hacia la derecha de los intervalos del inserto. Los resultados obtenidos para sodio y potasio, no presentan variaciones importantes de los intervalos de comparación. El fósforo muestra un intervalo de referencia más amplio, el valor superior se encuentra desplazado a la derecha del valor del intervalo de comparación. Respecto al magnesio, los intervalos calculados entre géneros son iguales, igual ocurre entre los géneros en los intervalos actuales. Sin embargo, los intervalos calculados de magnesio tienen valores más altos en el límite superior debido a que el rango calculado está desplazado hacia la derecha ~1 mg/dL. Finalmente, los intervalos calculados para el hierro difieren entre géneros, con mayor concentración en hombres. El intervalo de mujeres está desplazado ~8.5 µg/dL a la izquierda del intervalo del inserto; mientras que en el género masculino, el intervalo calculado es más amplio en los dos extremos de 15-167 µg/dL *versus* 31-144 µg/dL del intervalo de comparación.

Discusión

La identificación de los valores de referencia en cada población es responsabilidad del laboratorio clínico local mediante el procedimiento recomen-

dado por la Federación Internacional de Química Clínica y Laboratorio Clínico (IFCC, *International Federation of Clinical Chemistry*), esto permite homogenizar los criterios para la obtención de intervalos de referencia en los distintos países, y facilita el análisis de la variabilidad biológica entre las diferentes razas.^{15,16} Por lo anterior, los valores conocidos tradicionalmente como normales están sujetos indudablemente a la variabilidad biológica individual y colectiva,¹⁷ debido a ello es necesario incluir los factores de variabilidad dentro de su definición. Por consecuencia, es necesario determinar la magnitud de los valores en cada población, así como en la partición de la misma (género, edad, etcétera).

Los resultados de este estudio mostraron variaciones entre los intervalos de referencia calculados para la población evaluada de manera cotidiana y los intervalos proporcionados en el inserto, los cuales corresponden a poblaciones raciales distintas. Las variaciones en los intervalos más notables fueron para metabolitos como el BUN, la urea y la relación BUN/CREA; la población analizada mostró intervalos desplazados, principalmente a valores más altos. Algunas enzimas también presentaron intervalos desplazados a la derecha como la ALT, GGT y LDH, al igual que las proteínas totales en edades tempranas. La tendencia de los valores de las enzimas hepáticas probablemente es consecuencia del alto consumo de alcohol dentro de la población mexicana.¹⁸ Los electrolitos como cloro, fósforo y magnesio, tienen valores más altos en ambos géneros, probablemente por el sedentarismo de la población analizada.¹⁹ Mientras que los valores calculados para hierro muestran una tendencia hacia concentraciones menores, quizá debido a la deficiencia de hierro descrita en mujeres mexicanas.²⁰

Los intervalos obtenidos en un laboratorio clínico difieren de los intervalos sugeridos por las casas comerciales, incluso pueden diferir de los valores sugeridos por normas oficiales mexicanas.²¹ En nuestro estudio, los datos se obtuvieron de

pacientes sin un control estricto de las variables preanalíticas; por lo tanto, el estudio es susceptible a algunas variables como la dieta, los medicamentos, la actividad física, el estado socioeconómico, los ritmos circunales y la historia médica.^{11,13} En contraste, las variables analíticas (particularmente en el procedimiento de la prueba) fueron depuradas mediante un control estricto del procedimiento, según los estándares de calidad de la institución. Sin embargo, los errores analíticos son comunes y abarcan situaciones de lo más simples hasta lo complejo con capacidad de influir en los resultados de la prueba.²²

Dentro del procedimiento para la obtención de intervalos de referencia, es necesario obtener las distintas fracciones de una muestra (plasma, suero y células sanguíneas) en plazos que prevenga el deterioro de la calidad de la muestra y la importancia de utilizar sueros claros no lipémicos, ya que esta condición interfiere en múltiples pruebas de laboratorio.²³ En investigaciones posteriores, es conveniente realizar la determinación de intervalos de referencias para otros grupos de partición, que incluyan condiciones como embarazo, lactancia,^{24,25} e incluso en pacientes diagnosticados con alguna enfermedad en sus diferentes estadios. Adicionalmente, el análisis de los intervalos de referencia en distintas épocas del año podría aclarar las fluctuaciones circadianas de las concentraciones de los diferentes analitos. Previo a la toma de decisión en el diagnóstico o monitoreo del paciente, es necesario determinar los valores de referencia de la población para una interpretación más confiable y que la práctica clínica de este tipo de pruebas depure en lo posible los errores postanalíticos que pueden trascender en la salud y la vida del paciente.

Conclusiones

Los intervalos de referencia de las pruebas clínicas analizadas, en algunos casos, muestran diferencias respecto a los intervalos sugeridos por el inserto, e incluso pueden diferir de los valores sugeridos

por asociaciones internacionales. Es recomendable determinar los intervalos de referencia en cada laboratorio clínico mediante el procedimiento cotidiano utilizado.

Referencias

1. Heni M, Ketterer C, Thamer C, Herzberg-Schäfer SA, Guthoff M, Stefan N, Machicao F et al. Glycemia Determines the Effect of Type 2 Diabetes Risk Genes on Insulin Secretion. *Diabetes* 2010; 59: 3247-3252.
2. Aradillas C, Tenorio E, Flores J, De la Cruz E, Calderón J, Hernández H et al. Valores de referencia de insulina y lípidos en jóvenes de 16 a 18 años de edad en la ciudad de San Luis Potosí. *Bioquímica* 2003; 28 (2): 9-13.
3. Moridani MY, Bromberg IL. Lipase and pancreatic amylase *versus* total amylase as biomarkers of pancreatitis: an analytical investigation. *Clin Biochem* 2003; 36: 31-33.
4. Sakugawa H, Nakayoshi T, Kobashigawa K, Yamashiro T, Maeshiro T, Miyagi S et al. Clinical usefulness of biochemical markers of liver fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2005; 11 (2): 255-259.
5. Oh MK, Winn J, Poordad F. Review article: diagnosis and treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2008; 28: 503-522.
6. Muller F, Dommergues M, Bussières L, Lortat-Jacob S, Loirat C, Oury JF et al. Development of human renal function: reference intervals for 10 biochemical markers in fetal urine. *Clin Chem* 1996; 42 (11): 1855-1860.
7. Wang X, Xu G, Li H, Liu Y, Wang F. Reference intervals for serum creatinine with enzymatic assay and evaluation of four equations to estimate glomerular filtration rate in a healthy Chinese adult population. *Clin Chem Acta* 2011; 412: 1793-1797.
8. Perkins SL, Livesey JF, Belcher J. Reference intervals for 21 clinical chemistry analytes in arterial and venous umbilical cord blood. *Clin Chem* 1993; 39 (6): 1041-1044.
9. Quiroz RGF, Candanosa ME, Bouda J. Importancia de la evaluación del equilibrio ácido-básico y electrolitos en pequeñas especies. *Revista AMMVEPE*. 1997; 8 (2): 53-58.
10. Ring T, Frische S, Nielsen S. Clinical review: Renal tubular acidosis - a physicochemical approach. *Critical Care* 2005; 9: 573-580.
11. Boyd JC. Defining laboratory reference values and decision limits: populations, intervals, and interpretations. *Asian J Androl* 2010; 12: 83-90.
12. Geffré A, Friedrichs K, Harr K, Concordet D, Trumel C, Braun JP. Reference values: a review. *Vet Clin Pathol* 2009; 38 (3): 288-298.
13. Fraser CG. Biological variation: from principle to practice. USA: American Association for Clinical Chemistry, 2001: 91-116.
14. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guidelines. 3rd ed. CLSI document C28-A3. Wayne, PA, 2008: 11-25.
15. Chan AOK, Lee KC, Leung JNS, Shek CC. Reference intervals of common serum analytes of Hong Kong Chinese. *J Clin Pathol* 2008; 61: 632-636.
16. Carlsson L, Lind L, Larsson A. Reference Values for 27 Clinical Chemistry Tests in 70-Year-Old Males and Females. *Gerontol* 2010; 56: 259-265.

17. Terrés-Speziale AM. Importancia de la variabilidad biológica y de la relevancia médica en la Norma ISO-15189. *Rev Mex Patol Clin* 2006; 53 (4): 185-196.
18. Secretaría de Salud. Encuesta Nacional de Adicciones (ENA). El consumo de alcohol en México: tabaco, alcohol y otras drogas. México: SSA; 2008.
19. Ramos DMC, Mancera EMS, García-Vega O. Perfiles hematológicos e hidroelectrolíticos en sujetos sedentarios durante ejercicio de resistencia: efecto de la hidratación. *Rev Med* 2007; 15 (1): 26-39.
20. Casanueva E, Regil LM, Flores-Campuzano MF. Anemia por deficiencia de hierro en mujeres mexicanas en edad reproductiva. Historia de un problema no resuelto. *Salud Pub Mex* 2006; 48: 166-175.
21. García-Jiménez S, Martínez-Salazar MF, Monroy-Noyola A, Juantorena-Ugás A, Sánchez-Alemán MA. Intervalos de referencia del perfil de lípidos en trabajadores y estudiantes de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México. *Rev Biomed* 2011; 22: 3-10.
22. Pérez-Martínez MP, Velasco-Ortiz R, Fuentes-Mancilla LM, Alva-Estrada SI. Programa de evaluación de la calidad entre laboratorios, XVIII. La evaporación afecta la calidad. *Laborat Acta* 1998; 10: 59-2.
23. Méndez EC, Rosero-Bixby L, Fernández XR, Barrantes KJ. Comparación de los resultados de pruebas de laboratorio seleccionadas de un estudio poblacional de adultos mayores de Costa Rica. *Población y Salud en Mesoamérica* 2007; 5 (1): 1-15.
24. Larsson A, Palm M, Hansson L, Axelsson O. Reference values for clinical chemistry tests during normal pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 2008; 115: 874-881.
25. Davison JM, Lind T, Lindheimer MD. Reference values for clinical chemistry tests during normal pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 2008; 115 (13): 1716-1717.

Autoanticuerpos antitiroglobulina en la determinación de tiroglobulina durante el seguimiento de pacientes operados de carcinoma diferenciado de tiroides

Palabras clave: Cáncer diferenciado de tiroides, autoanticuerpos antitiroglobulina, tiroglobulina.

Key words: Differentiated cancer of thyroid, thyroglobulin antibodies, thyroglobulin.

Recibido: 07/09/2012
Aceptado: 14/12/2012

Este artículo puede ser consultado en versión completa en:
www.medigraphic.com/patologiaclinica

Sinconegui Belkys,* Marrero María Teresa,** Oliva Juan Perfecto,*
Martínez Aldo Íñez,* Velasco Milagros*

* Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología. La Habana, Cuba.

** Instituto Nacional de Endocrinología. La Habana, Cuba.

Correspondencia:
MsC Belkys Sinconegui Gómez
Calle 29 y F Plaza, CP 10400,
La Habana, Cuba.
E-mail: belkys@inor.sld.cu

52

Resumen

El cáncer de tiroides constituye la neoplasia endocrinológica más frecuente. La tiroglobulina humana es el principal marcador de recidiva del cáncer diferenciado de tiroides. La premisa anterior es válida siempre y cuando no existan autoanticuerpos antitiroglobulina (TgAb) que puedan interferir en su medición, siendo éste el principal problema analítico que compromete la utilidad de la tiroglobulina como marcador tumoral y que limita su utilidad clínica. Fueron estudiados 100 pacientes atendidos en las consultas de tiroides del Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología de Cuba a quienes se les practicó tiroidectomía total por presentar cáncer diferenciado de tiroides. Fueron incluidos en el estudio 83 mujeres y 14 hombres (edad media de 45.1 ± 11.2 años). Se les determinaron los niveles de tiroglobulina y de autoanticuerpos antitiroglobulina en suero, empleando para ello dos métodos inmunométricos: un método inmunoradiométrico y un radioinmunoensayo, respectivamente. Se estudió la interferencia que ejercen los autoanticuerpos tiroglobulina en la cuantificación de tiroglobulina en los pacientes operados de carcinoma diferenciado del tiroides. El test de recobrado no brinda información confiable de la interferencia de los autoanticuerpos antitiroglobulina en la determinación de tiroglobulina. A todas las muestras de sangre enviadas al laboratorio para la

Abstract

The thyroid cancer constitutes the endocrinology neoplasia the most frequency. The human thyroglobulin is the main tumor marker during the postoperative follow-up of patients presenting with thyroid differentiated cancer. The previous premise is valid if don't exist thyroglobulin antibodies that can interfere in its quantification, being this the analytic main problem that involve the utility of the thyroglobulin like tumor marker and that it limits its clinical utility. One hundred patients were studied assisted in the thyroid surgery of the National Institute of Oncology and Radiobiology to who you practiced total thyroidectomy to present differentiated cancer of thyroid. 83 women and 14 men were included in this study (half age of 45.1 ± 11.2 years). They were assessment the thyroglobulin levels and of thyroglobulin antibodies in serum, using for it two different methods immunometrics; Immunoradiometric method and radioimmunoassay respectively. We studied the interference that provokes the thyroglobulin antibodies in the quantification of thyroglobulin during the postoperative follow-up of patients presenting with thyroid differentiated cancer. The recovery test does not provide reliable information of the interference of antithyroglobulin autoantibodies in the determination of thyroglobulin.

determinación de tiroglobulina, también se les debe realizar la cuantificación de la interferencia de autoanticuerpos antitiroglobulina. Con los resultados obtenidos se debe establecer un protocolo para el seguimiento de los pacientes operados de carcinoma diferenciado de tiroides.

For all blood samples sent to the laboratory for determination of thyroglobulin, they should also perform quantization of antithyroglobulin autoantibodies interference. With the results, a protocol should be established for monitoring patients operated for differentiated thyroid carcinoma.

Introducción

El cáncer de tiroides constituye la neoplasia endocrinológica más frecuente. El tratamiento del carcinoma diferenciado del tiroides se basa en la tiroidectomía total, seguida de terapia ablativa con radioyodo. En el seguimiento se utilizan el control de imágenes, la exploración sistémica y la medición de la tiroglobulina sérica.

La tiroglobulina humana (Tg) es una glicoproteína sintetizada exclusivamente por las células foliculares tiroideas y constituye 75% del contenido proteico de la glándula tiroides.¹ Es la precursora para la síntesis de las hormonas tiroideas. El gen que codifica para esta proteína se encuentra en el cromosoma 8 y está constituido por más de 300 kb y 48 axones que codifican una proteína de 660 kDa. La síntesis tiroglobulina y de las hormonas tiroideas es estimulada a través de la activación del receptor de la hormona estimulante del tiroides.²

La medición de tiroglobulina (Tg) constituye el principal marcador de recidiva del cáncer diferenciado de tiroides (CDT), siendo más sensible que los métodos imagenológicos, especialmente cuando se determina de forma estimulada, es decir, cuando los niveles plasmáticos de tirotrópina (TSH) son elevados o a través del uso de TSH recombinante humana. La determinación de valores de tiroglobulina (Tg) muy bajos o indetectables indica ausencia de recidiva tumoral.³

La interferencia que provocan los autoanticuerpos antitiroglobulina (TgAb) sobre la cuantificación de Tg sérica ha sido reconocida por más de 30 años.^{4,5} Si consideramos que la prevalencia de estos autoanticuerpos en el CDT es mayor ($\approx 20\%$) que

la encontrada en la población general ($\approx 10\%$),⁶⁻¹⁰ esta problemática cobra mayor importancia. Actualmente, ningún método de Tg está libre de esta interferencia cuando se emplean sueros positivos de TgAb, aunque algunos resultan ser más resistentes que otros al analizar la correspondencia entre los valores de Tg sérica y el estado clínico de los pacientes.⁷

Los TgAb pueden interferir en la metodología de cuantificación de Tg, ya sea subestimando el valor de Tg y dando como resultados valores falsos negativos en el caso de los métodos inmunoradiométricos (IRMA) o sobreestimando este valor y dando resultados falsos positivos en el caso de los radioinmunoensayos (RIA).⁶

El valor del *test* de recobrado para excluir la interferencia por estos autoanticuerpos ha sido ampliamente cuestionado. Actualmente, se reconoce internacionalmente que el ensayo de recobrado no es un procedimiento confiable para detectar la interferencia por TgAb, siendo éste el principal problema que limita la utilidad clínica de ese marcador.^{7,8,11,12}

Cuando los TgAb están presentes, las moléculas de Tg circulan en dos formas, en estado libre y formando inmunocomplejos. La medición exacta de la fracción total es el mejor estimado de la secreción de Tg por el tumor en pacientes positivos de TgAb; sin embargo, modificaciones en la concentración de Tg, no sólo reflejarán cambios en la masa tumoral, sino también cambios en la afinidad de los TgAb y en la eliminación metabólica de los inmunocomplejos Tg-TgAb circulantes. Desafortunadamente la mayoría de los métodos actuales no miden los niveles totales de Tg en presencia de estos anticuerpos.

Se ha descrito que la concentración de los TgAb tiende a desaparecer luego de la eliminación de todo tejido tiroideo, lo que implicaría el cese del estímulo antigénico, tanto del tejido tiroideo normal como del neoplásico. Basado en este planteamiento, algunos autores han sugerido que los TgAb podrían ser utilizados como marcadores indirectos de recidiva tumoral en los pacientes tratados por CDT positivos de TgAb e indicar persistencia o recurrencia de la enfermedad.^{8,13,14}

Los objetivos del presente trabajo son dos: el primero es conocer la interferencia de los TgAb en la determinación sérica de Tg en el seguimiento de los pacientes tratados por CDT, y el segundo es analizar los resultados desde el punto de vista práctico que brinda el *test* de recobrado en la determinación de Tg.

Material y métodos

Fueron estudiados 100 enfermos atendidos en las consultas de tiroides del Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología (INOR), a quienes se les practicó tiroidectomía total por presentar cáncer diferenciado de tiroides (CDT). Los pacientes incluidos en el estudio fueron 83 mujeres y 14 hombres, con edad media de 45.1 ± 11.2 años. A estos sujetos después de un tratamiento inicial por tiroidectomía y posteriormente tratados con yodo radioactivo, se les determinaron los niveles de Tg y se les realizó el *test* de interferencia para detectar la presencia o no de TgAb. Por otro lado, también se les aplicó la determinación de TgAb en suero, empleando para ello dos procedimientos inmunométricos; un método IRMA y un RIA, respectivamente.

Determinación de tiroglobulina (Tg) sérica: La determinación de Tg en suero fue realizada después de suspendido por tres semanas el tratamiento sorpresivo con levotiroxina L-T4, es decir, en condición estimuladora, utilizando el siguiente método: hTg [125I] IRMA KIT. La sensibilidad analítica del método es de 0.022 ng/mL y la sensibilidad

funcional es 0.1 ng/mL. Cualquier valor de Tg < 0.1 ng/mL (sensibilidad funcional del método) fue considerado como negativo.

Test de recobrado: Los valores de recobrado entre 70 y 130% son considerados sin interferencia de TgAb. Los resultados menores de 70% o mayores de 130% presentan interferencia.

Determinación de autoanticuerpos antitiroglobulina (TgAb): La determinación de TgAb fue realizada utilizando el siguiente método: Anti-hTg [125I] RIA KIT. La sensibilidad funcional es de 30 UI/mL y el valor de referencia para una población normal es < 100 UI/mL. Cualquier valor de TgAb > 30 UI/mL (sensibilidad funcional del método) fue considerado como positivo.

Los resultados se presentan en forma de porcentajes. Se utilizó el programa de Microsoft Excel para el procesamiento estadístico de los datos.

Resultados y discusión

Interferencia de TgAb en la determinación de Tg en suero. La interferencia que provocan los TgAb sobre la cuantificación de Tg sérica realizada tanto por la metodología IRMA como RIA, ha sido reconocida por más de 30 años.^{10,15} Esta interferencia constituye el principal problema que compromete la utilidad clínica de la determinación de Tg.¹⁰ Los resultados que reportan los IRMA de Tg sérica frecuentemente no son detectables en pacientes positivos a TgAb con CDT.⁸

En este estudio, 29% de los enfermos con valores no detectables de Tg (tomando como referencia la sensibilidad funcional del método < 0.1 ng/mL) presentaron valores detectables de TgAb (> 30 UI/mL). La interferencia de los TgAb es muy común, pero no siempre a elevados títulos del anticuerpo, como se registra también en este estudio. Sin embargo, cualquier TgAb presente en la muestra tiene el potencial de interferir en la determinación de Tg, lo que resulta en un valor falso negativo.⁷ Los pacientes con tiroidectomía total y tratamiento de ablación completa del teji-

do tiroideo, con la consecuente eliminación de la producción de Tg, no deberían presentar valores detectables de TgAb. La persistencia de estos TgAb por largo tiempo después del tratamiento, podría indicar la presencia de tejido productor de Tg, en este caso con altas probabilidades de metástasis.

Por otra parte, los pacientes libres de la enfermedad tienden a no producir TgAb, por lo que se considera que la utilidad clínica de los TgAb en estos enfermos con CDT es doble.⁷ En primer lugar, la búsqueda de TgAb en estos pacientes con cáncer es necesaria, porque incluso bajas concentraciones de anticuerpos pueden interferir con las mediciones de Tg realizadas por la mayoría de los métodos, subvalorando o sobreestimando su valor según el método. En segundo lugar, las determinaciones de TgAb en sí pueden servir como marcador tumoral sustitutos para los pacientes TgAb positivos en los que no se puede confiar en la determinación de Tg, siempre y cuando se utilice el mismo ensayo para su determinación. La población de TgAb es heterogénea, lo cual repercute en el hecho de que los diferentes métodos difieren en cuanto a sensibilidad y especificidad, favorecido por el uso indistinto de éstos.^{3,15}

Los métodos IRMA no competitivos parecen ser más susceptibles a la interferencia producida por TgAb que los métodos RIA.^{16,17} Aparentemente, en algunos casos los IRMA no pueden cuantificar la Tg acomplejada con los TgAb y ésta pudiera ser una de las causas de la subestimación de la concentración de Tg total analizada con estos métodos.

Los estudios de recobrado con Tg humana exógena han demostrado que la subestimación es siempre característica de los métodos inmunoradiométricos (IRMA), en los cuales las moléculas de Tg sérica endógena acomplejadas con los TgAb endógenos están impedidas de participar completamente en la reacción no competitiva «sándwich»: anticuerpo, señal-antígeno-anticuerpo, captura.^{9,18} Por esta razón, los resultados que reportan los IRMA de Tg sérica son frecuentemente no detectables en pacientes con CDT y bocio tóxico difuso,

ambos positivos a TgAb.¹⁰ En esta situación, los niveles de Tg sérica resultan inapropiadamente bajos (falso negativo) en pacientes positivos a TgAb que presenten persistencia o recidiva del CDT. La vulnerabilidad de un IRMA de Tg a la interferencia por TgAb es dependiente del método e impredecible, pues ésta guarda relación con las características de los TgAb endógenos y la relación entre la Tg libre y la acomplejada con los TgAb circulantes.¹⁰

Valor del test de recobrado en la determinación de Tg. En este estudio del laboratorio se encontró que 34% de los pacientes con interferencia por TgAb, no presentaron valores detectables de TgAb, es decir, valores por encima de la sensibilidad funcional del método (TgAb > 30 UI/mL); mientras que 3% de los sujetos sin interferencia por TgAb presentaron valores detectables de TgAb. Estos casos constituyen falsos negativos ante TgAb que escapan al tratamiento de una posible recidiva de la enfermedad.⁵ Esto pudiera ser explicado por el uso de diferentes isoformas inmunorreactivas en la preparación de los *test* y a la heterogeneidad que presentan las moléculas de TgAb.¹⁷ Debido a que los TgAb son heterogéneos, ni la medición de la concentración de estos anticuerpos ni un ensayo de recuperación con Tgh exógeno permiten predecir si los TgAb causarán interferencias.^{16,19,20} Estudios similares acerca de los ensayos de recuperación de Tg son del criterio de que este *test* no es un método confiable para la determinación de Tg.

Conclusiones

El *test* de recobrado no brinda información confiable de la interferencia de los TgAb en la determinación de Tg.

A todas las muestras de sangre enviadas al laboratorio para la determinación de tiroglobulina, también se debe realizar la cuantificación de la interferencia de TgAb. Con los resultados obtenidos se debe establecer un protocolo para el seguimiento de los pacientes operados de carcinoma diferenciado de tiroides.

Referencias

1. Spencer C. Thyroglobulin. In: Werner SC, Ingbar SH, Braverman LE, Utiger RD. *Werner and Ingbar's. The Thyroid: A fundamental and clinical text*. 9th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2005: 345-353.
2. Van de Graff Sar, Ris-Stalpers C, Pauws E, Mendive FM. Up to date with human thyroglobulin. *J Endocrinol* 2001; 170: 307-321.
3. Mazzaferri E, Robbins R, Spencer A. Consensus report of the role of serum thyroglobulin as a monitoring method for low-risk patients with papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 1433-1434.
4. Spencer CA. Serum thyroglobulin measurements: clinical utility and technical limitations in the management of patients with differentiated thyroid carcinoma. *Endocrine Practice* 2000; 6: 481-484.
5. Spencer CA, Takeuchi M, Kazarosyan M, Wang CC, Guttler RB, Singer PA et al. Serum thyroglobulin autoantibodies: Prevalence, influence on serum thyroglobulin measurement, and prognostic significance in patients with differentiated thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 1121-1127.
6. Spencer CA, Bergoglio LM, Kazarosyan M. Clinical impact of thyroglobulin (Tg) and Tg autoantibody method differences on the management of patients with differentiated thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 5566-5575.
7. Spencer CA, LoPresti JS. Technology Insight: Measuring thyroglobulin and thyroglobulin autoantibody in patients with differentiated thyroid cancer. Available in: <http://www.nature.com/clinicalpractices/endmel> (Access: Abril, 2008).
8. Demers LM, Spencer CA. Laboratory support for the diagnosis and monitoring of thyroid disease. *The National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine. Practice Guidelines*. Available in: <http://www.nacb.org/lmpg/thyroid/LMPG/Wordstm> 2002 (Access: February, 2008).
9. Spencer CA, Wang CC. Thyroglobulin measurement. Techniques, clinical, benefits and pitfalls. *Thyroid Cancer I. Endocrinol Metabol Clin North Ame* 1995; 24: 841-863.
10. Hjiyiannakis P, Mundy J, Harmer C. Thyroglobulin antibodies in differentiated thyroid cancer. *Clin Oncol* 1999; 11: 240-244.
11. Cooper DS, Doherty GM, Hagen BR, Kloos RT, Lee SL, Mandel SJ et al. Management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *The American Thyroid Association Guidelines Taskforce. Thyroid* 2006; 16: 109-142.
12. Schlumberger M, Benhamou F. Comparison of seven serum thyroglobulin assays in the follow-up of papillary and follicular thyroid cancer patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 2487-2495.
13. Chiovato L, Latrofa F, Braverman LE, Pacini F et al. Disappearance of humoral thyroid autoimmunity after complete removal of thyroid antigens. *Ann Intern Med* 2003; 139: 346-351.
14. Phan HTT, Jager PL, Van der Wal JE et al. The follow-up of patients with differentiated thyroid cancer and undetectable thyroglobulin (Tg) and Tg antibodies during ablation. *Eur J Endocrinol* 2008; 158: 77-83.
15. Matsubayashi S, Kawai K, Matsumoto Y. The correlation between papillary thyroid carcinoma and lymphocytic infiltration in the thyroid gland. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 3421-3424.
16. Spencer CA. Recoveries cannot be used to authenticate thyroglobulin (Tg) measurements when sera contain Tg autoantibodies. *Clin Chem* 1996; 42: 661-663.
17. Massart C, Maugeudre D. Importance of the detection method for thyroglobulin antibodies for the validity of thyroglobulin measurements in sera from patients with Graves' disease. *Clin Chem* 2002; 48: 102-107, 319.
18. Mariotti S, Barbesino G, Caturegli P, Marino M, Manetti L, Pacini F et al. Assay of thyroglobulin in serum with thyroglobulin autoantibodies: an unobtainable goal? *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80.
19. Schulz R, Bethauser H, Stempka L, Heilig B, Moll A, Hufner M. Evidence for immunological differences between circulating and tissue-derived thyroglobulin in men. *Eur J Clin Invest* 1989; 19: 459-463.
20. Spencer CA, Takeuchi M, Kazarosyan M. Current status and performance goals for serum thyroglobulin assays. *Clin Chem* 1996; 42: 164-173.

Leptospirosis; un problema de salud pública

Palabras clave: *Leptospira*, leptospirosis, zoonosis, enfermedad de Weil, serovares.

Key words: *Leptospira*, leptospirosis, zoonoses, Weil's disease, serovars.

Recibido: 23/01/2013
Aceptado: 15/02/2013

Este artículo puede ser consultado en versión completa en:
www.medigraphic.com/patologiaclinica

Rafael García-González,* Angélica Reyes-Torres,* David Basilio-Hernández,* Maritona Ramírez-Pérez,* Beatriz Rivas-Sánchez**

* Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina (FM), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

** Departamento de Medicina Experimental, FM, UNAM.

Los autores agradecen el apoyo otorgado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), otorgado mediante el proyecto IN215009

Correspondencia:

Rafael García-González

Facultad de Medicina, Edificio A, Primer piso, Universidad 3000, Circuito interior. 04510, México, D.F. Tels.: 5623 2389 y 5623 2390 E-mail: rafagargon@hotmail.com

Resumen

La leptospirosis es una zoonosis con una amplia distribución mundial que se presenta principalmente en zonas tropicales, subtropicales y templadas. Es considerada un problema de salud pública mundial reemergente, debido a su incremento tanto en países en desarrollo como desarrollados. Anualmente se reportan más de 500,000 casos severos y mortalidad superior a 10%. El género *Leptospira* comprende especies saprófitas como patógenas. Estas últimas aisladas de un amplio rango de animales que sirven como reservorios. El diagnóstico de laboratorio es complejo y no se encuentra siempre disponible. Por otro lado, la selección correcta de las muestras clínicas, las pruebas y la correcta interpretación de éstas, es un parámetro importante para darle al paciente una mejor atención. *Leptospira* puede ser detectada a través de su aislamiento o por medio de su demostración por campo oscuro, impregnación argéntica e inmunodetección: inmunohistoquímica e inmunofluorescencia, o bien, por amplificación de fragmentos específicos de ADN y por determinación de anticuerpos en contra de la bacteria (evidencia indirecta).

Introducción

La leptospirosis es una enfermedad infecciosa reemergente ocasionada por bacterias patógenas pertenecientes al género *Leptospira*, que afecta a humanos y animales tanto domésticos como silvestres y es causante de múltiples brotes en diferentes países (Nicaragua, El Salvador, Brasil, India, entre otros).^{1,2} Se caracteriza por afectar

Abstract

Leptospirosis is a zoonotic disease with a worldwide distribution, and occurs in tropical, subtropical and temperate zones. Considered to be the most geographically widespread zoonosis. Leptospirosis has been recognized as an emerging global public health problem because of its increasing incidence in both developing and developed countries. More than 500,000 cases of severe leptospirosis are reported each year, with fatality rates exceeding 10%. The genus *Leptospira* comprises saprophytic and pathogenic species, isolated from wide range of animal reservoir species. Laboratory diagnosis is complex and not widely available. Selection of the right specimens, tests and correct interpretation of test results are important parameters to provide better patient care. The *Leptospira* is detected by isolation of organism or demonstration by dark field, silver impregnation and immunodetection; microagglutination and immunofluorescence or amplification of specific fragment of Leptospiral DNA and indirect evidences by detection of antibodies to leptospire.

a grupos de riesgo con exposición ocupacional o recreativa. La transmisión puede ser directa o indirecta de los animales al humano. Es considerada una zoonosis y un problema de salud pública, con amplia distribución mundial, afectando tanto países en desarrollo como desarrollados que cuentan con características climatológicas y orográficas, con redes pluviales naturales y artificiales, con extensas áreas agrícolas y presencia de lluvias estacionales

que favorecen la propagación de *Leptospira*, afectando tanto al hombre como a los animales.^{1,3,4}

El espectro clínico de la enfermedad en humanos es extremadamente amplio, con un rango que va de infecciones subclínicas, anictéricas, ictericas, a síndromes severos de afectación pulmonar y multiorgánica (fiebre hemorrágica pulmonar y la fiebre icterohemorrágica o síndrome de Weil), con elevadas tasas de mortalidad.²

Antecedentes históricos

La leptospirosis es conocida con diferentes nombres: enfermedad de Weil, enfermedad de los porqueros, fiebre de los arrozales, fiebre de los cañaverales, etcétera.

Existen reportes que describen síndromes muy parecidos a este padecimiento en civilizaciones antiguas: se cuenta con vestigios de la antigua Mesopotamia, que mencionan signos patológicos sugerentes de leptospirosis; lo mismo se puede deducir de papiros recuperados del antiguo Egipto (2500 a.C.) y de evidencias que mencionan su existencia en la Grecia de Hipócrates y Galeno, y tiempo después durante las campañas bélicas de Napoleón.³

En 1802, Lacereaux hizo la primera descripción clínica de un padecimiento muy parecido a leptospirosis y, en 1883, Landarouzi describió un caso típico con ictericia y hemorragias, al que llamó «tifus hepático». En 1886, casi al mismo tiempo, Mathieu en Francia y Adolf Weil en Alemania, describieron casos clínicos con cuadros agudos de fiebre, ictericia y daño renal severo; debido a la relevancia del trabajo de este último, en 1887 el padecimiento fue nombrado por Goldschmidt como «enfermedad de Weil».⁴

En 1907, Stimson pudo visualizar al microorganismo en un corte de riñón de un paciente muerto por fiebre amarilla y, debido a su morfología, lo nombró *Spirochaeta interrogans*. En 1914, los japoneses Inada e Ido encontraron una espiroqueta en el hígado de cobayos infectados experimentalmen-

te con sangre de mineros que presentaban fiebre severa, con eventos hemorrágicos, por lo que la denominaron *Spirochaeta icterohaemorrhagiae*.^{1,3} En 1915, estos mismos autores lograron aislar y cultivar al agente causal.⁴ Entre 1917 y 1918, Noguchi propuso el género *Leptospira*, dando el nombre definitivo al agente causal de leptospirosis. Durante la Primera Guerra Mundial, en Europa hubo brotes de leptospirosis en soldados alemanes que combatían.^{1,3} En 1922 se reportó el primer caso de este padecimiento en Estados Unidos, y hasta 1946, ya se había reportado la enfermedad en 46 países.³ En 1947, Wood aisló *Leptospira* en excretas de ratas grises en Estados Unidos.^{3,5}

En México, es escasa la información que existe acerca de la leptospirosis humana, y los datos disponibles, en su mayoría, provienen de estudios seroepidemiológicos. Los primeros casos fueron notificados en pacientes por Noguchi y Kliegler en Mérida, Yucatán, en 1919,^{3,6} y en 1920 aislaron al microorganismo (*Leptospira icteroides*) de la sangre de pacientes; posteriormente, Pérez-Grovas y LeBlanc notificaron casos en el puerto de Veracruz. En 1937, Bustamante mencionó tres casos de la enfermedad de Weil en pescadores de ostras de Tampico, Tamaulipas; en este mismo estado, en 1938, Castañeda aisló *Leptospira* en ratas.⁷ En la década de los 50, Varela y su grupo realizaron varios estudios acerca de la leptospirosis, sobre todo en incidencia geográfica y portadores del agente causal en Veracruz, Tampico y en el Distrito Federal. En 1958, se reportó el primer brote epidémico en Yucatán. En el mismo año, Mendoza-Hernández observó 10% de aglutininas leptospirales en el suero de 91 pacientes con diagnóstico de hepatitis.⁷ Uno de los primeros estudios que evidenció seroprevalencia importante en México fue el realizado por Varela y Zavala en 1961, que mostró un porcentaje de 18% en 10,362 sueros estudiados procedentes de 21 estados de la República Mexicana.⁸ Por otro lado, en 1997, Colín-Ortiz y colaboradores, en un estudio realizado entre 1961 y 1995, con 9,875

sueros obtenidos en Yucatán, Valle de México y Distrito Federal, encontraron un promedio de 14.4% positivos.⁹ En 1991, Caballero y asociados encontraron 39% de seroprevalencia en trabajadores de granjas ganaderas y porcinas.¹⁰ En 1995, Gavaldón y su grupo analizaron 206 muestras de sueros de donadores de sangre por aglutinación microscópica (MAT) contra siete serovares de *Leptospira interrogans*: 7% fueron positivos, de los cuales 53% reaccionaron con el serovar Shermani, 33% con Canicola, 20% con Pyrogens, 13% con Pomona y 6% con Icterohaemorrhagiae. Por otro lado, la más alta frecuencia de seropositividad se encontró en el grupo de edad de 20-39 años.¹¹ En el 2006, Navarrete-Espinosa y colaboradores realizaron un estudio transversal en 500 habitantes de Jáltipan, Veracruz, mediante un muestreo por hogares, aplicación de cuestionario y toma de muestras sanguíneas; encontraron seroprevalencia global de 4% y la mayor incidencia fue para el grupo en edad productiva; 85% de los positivos a *Leptospira* también fueron positivo a dengue. Estos resultados muestran que, aunque la prevalencia es baja, se confirmó la coexistencia de estos agentes.¹² En 2002, Vado-Solis y colaboradores realizaron un estudio clínico-epidemiológico en humanos y reservorios animales en el estado de Yucatán, a través del análisis serológico utilizando IgM *Leptospira* Dipstick™ y MAT; el estudio se realizó en 400 personas de una población abierta, 439 casos de probable leptospirosis y 1,060 reservorios (vacas, cerdos, perros, ratas y zarigüeyas); encontraron seroprevalencia de 14.2% en humanos. Los serovares predominantes en la población abierta fueron Tarassovi, Hardjo, Pomona y Panama.⁴

En 2007, Navarrete y asociados realizaron un estudio transversal prospectivo en 204 habitantes de Izamal, Yucatán; 88% fue positivo a la observación directa de sangre en campo oscuro, 87 y 50.5% fueron positivos a la MAT a títulos de 1:40 y 1:80, respectivamente. El serovar predominante fue Hardjo (94%), la mayor prevalencia fue en

mujeres (72%) y el grupo de mayores de 45 años (95.7%); los factores de riesgo más importantes fueron: ser ama de casa, estar en contacto con agua estancada y con excretas de animales domésticos.¹³

Características generales de *Leptospira*

Las leptospirosis pertenecen al orden *Spirochaetales*, familia *Leptospiraceae* y género *Leptospira*, que comprende dos especies fenotípicas: *Leptospira biflexa*, no patógena, de vida libre, saprófita y se encuentra en ambientes húmedos y aguas superficiales, y *L. interrogans*, a la que pertenecen las leptospirosis patógenas causantes de la leptospirosis y que, de acuerdo con sus características serológicas, se clasifican en serogrupos constituidos por serovares.

Las leptospirosis son microorganismos helicoidales, enrolladas estrechamente, delgadas, flexibles de 5-60 µm de longitud por 0.1-0.5 µm de diámetro, constituidas por un cuerpo citoplasmático y un axostilo que se dispone en forma de espiral con una membrana envolvente que recubre ambas estructuras. Esta membrana externa multistratificada es rica en lípidos (20%); la bacteria presenta además peptidoglicano y, en algunos casos, ácido α, ε-diaminopilémico. La membrana externa contiene lipopolisacáridos (LPS) altamente inmunogénicos, responsables de la especificidad de los serovares, varias lipoproteínas (LipL32, LipL41), porinas (OmpL1, Omp85) que son altamente conservadas, constituyen el sitio de interacción con el hospedero y al parecer participan en la patogénesis de la nefritis intersticial y en la respuesta inmune innata.^{1,14} En la membrana interna, recubierta por el peptidoglicano, se encuentran lipoproteínas Sec, SPasa I y II, LolCDE y el cuerpo basal del endoflagelo, un sistema de secreción tipo II que enlaza ambas membranas¹⁵ (figura 1).

El axostilo consiste en dos filamentos axiales que se insertan en extremos opuestos del cuerpo

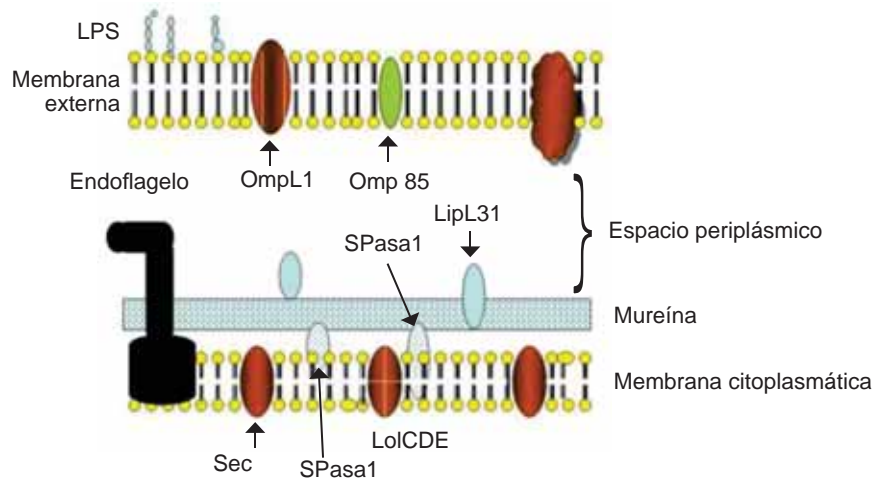


Figura 1. Estructura de la pared celular de *Leptospira* sp. (Modificado de Ko AI¹⁵).
 Imagen en color en: www.medigraphic.com/patologiaclinica



Figura 2. Observación de *Leptospira* sp por microscopía de campo oscuro.
 Imagen en color en: www.medigraphic.com/patologiaclinica



Figura 3. Impregnación argéntica de *Leptospira* sp mediante la técnica de Warthin-Starry.
 Imagen en color en: www.medigraphic.com/patologiaclinica

citoplasmático, por medio de botones terminales y extremos libres que se extienden hacia la mitad de la célula sin llegar a cruzarse. Este organelo es el encargado de la motilidad de la *Leptospira* y le confiere un movimiento activo de rotación. Dependiendo de la longitud, la bacteria tiene un promedio de 18 a 20 hélices por célula y la conformación es dextrógira (en dirección de las manecillas de un reloj). Las leptospiras se observan fácilmente con apoyo de microscopía de campo oscuro, teñidas con técnicas de inmunodetección e impregnación argéntica y se

colorean débilmente con colorantes de anilina (figuras 2 y 3). No se visualizan con microscopio de campo brillante y tinciones habituales. Con microscopía de campo oscuro, en fresco, puede observarse que una o ambas extremidades terminan en gancho.

Este microorganismo es sensible a la desecación, al calor, al frío excesivo y a las variaciones de pH; no toleran el medio ácido debido a que pierden su motilidad aproximadamente en 15 minutos. El pH óptimo para su multiplicación es de 7.2 a 7.4. No sobreviven en agua salada, pero pueden

permanecer hasta 180 días en agua dulce, tres semanas en aguas estancadas y hasta cerca de un año en soluciones viscosas, como lodos con bajo contenido de materia orgánica.¹⁶ En suelo húmedo sobreviven por largo tiempo, mientras que en suelo seco la supervivencia es corta. En la leche no sobreviven, salvo si está diluida en agua a razón de 1:20 o más. Mueren a los 10 segundos cuando son calentadas a 100 °C y a los 10 minutos a una temperatura de 56 °C. En el frío puede sobrevivir hasta 100 días a -20 °C.

La orina ácida es letal para las leptospiras, por eso, es necesario alcalinizarla si se pretende aislarla de la orina de un enfermo.¹⁷ Conservan su viabilidad varios días en vísceras y carnes refrigeradas y son sensibles a los antisépticos.^{3,12,18}

Leptospira posee dos cromosomas circulares de aproximadamente cuatro megapares de bases (Mpb) y 300 kilopares de bases (kpb) con un contenido de guanina/citosina (G/C) de 35-41%. Un replicón adicional de 74 kpb se ha localizado en *L. biflexa*, la cual puede tener un cuarto replicón de 74 kpb (bacteriófago LE1).¹⁵

Son microorganismos aerobios estrictos y fácilmente cultivables en medios artificiales, enriquecidos y adicionados con ácidos grasos de cadena larga. Los medios de Fletcher, Kortoff, Schüffner y EMJH son los más empleados. La base de esos medios está constituida por suero de conejo diluido o seroalbúmina, agar, peptona, caldos simples y sales. Utilizan ácidos grasos o alcoholes como fuente de carbono y energía y no utilizan aminoácidos o carbohidratos como fuente de energía. El recurso principal para la obtención de nitrógeno son las sales de amonio. La membrana corioalantoidea de huevos embrionados de gallina puede también ser utilizada para el cultivo de *Leptospira*.⁷ En los cultivos crecen mejor en aerobiosis a 30 °C, pH 6.8 a 7.8 en 10 a 14 días y en medios sólidos se desarrollan colonias redondas de 1-3 mm de diámetro en 6-10 días. Las leptospiras crecen en varias líneas celulares cultivadas *in vitro*, principalmente fibroblastos, en donde se puede apreciar efecto citopático.³

Las cepas patógenas tienen un tiempo de generación de cerca de 20 horas, mientras que en las saprofitas es de alrededor de cinco horas. Las leptospiras poseen oxidasa, catalasa y peroxidasa; entre especies no pueden distinguirse por sus características bioquímicas.³

Sin embargo, *L. interrogans* no crece en presencia de 225 µg/mL de azoguanina, propiedad que permite diferenciarla de *L. biflexa*. Son susceptibles a la acción de la mayoría de antibióticos, incluyendo penicilina, así como a la de los antisépticos y desinfectantes de uso común.¹⁸

Taxonomía

Los miembros del género *Leptospira* son serológicamente heterólogos. El taxón básico es el serovar (serotipo), que se define «sobre la base de similitudes y diferencias antigénicas como las reveladas en la llamada prueba de absorción de aglutinación cruzada» (*cross agglutination absorption test*). Cada serovar tiene una conformación antigénica característica proporcionada por antígenos superficiales localizados en la membrana externa que facilitan su clasificación. Los anticuerpos generados frente a los lipopolisacáridos de la pared celular son determinantes del serovar y tiene carácter protector, mientras que los formados frente a los antígenos profundos no son protectores ni específicos (antígenos de campo comunes a todo el género *Leptospira*).^{19,20} *L. interrogans sensu lato* se subdivide, según su composición antigénica, en más de 200 serovares que, por las reacciones antigénicas cruzadas entre ellos, se reúnen en 23 serogrupos y *L. biflexa* se subdivide en 60 serovares.¹

Las leptospiras saprofitas o acuáticas que se encuentran principalmente en agua dulce superficial y menos frecuente en agua salada, se asocian raramente con infecciones de mamíferos.¹⁵

Alrededor de 22 serovares de *L. interrogans* causan enfermedad humana y los más comunes son Icterohaemorrhagiae, Canicola, Pomona y Au-

tumnalis. Desde el punto de vista histórico, algunos serovares han sido asociados con cuadros clínicos específicos (Icterohaemorrhagiae, enfermedad de Weil; Pomona, enfermedad de Swineher; Autumnalis, fiebre de Fort Bragg y erupciones pretibiales), pero ahora se acepta que las diversas enfermedades no son específicas de serovar.

En la actualidad, tomando como base los estudios de ADN, la clasificación fenotípica está siendo reemplazada por la clasificación genética sin que exista ninguna relación o correspondencia entre ambas clasificaciones. Debido a lo anterior, existen especies genómicas o genomoespecies que incluyen serovares patógenos y no patógenos, y algunos serovares pueden pertenecer a más de una especie genómica. La clasificación constituida por genomoespecies, de acuerdo con la Reunión del Subcomité de Taxonomía de *Leptospira* en el 2007, comprende 13 especies patógenas: *L. interrogans*, *L. alexanderi*, *L. fainei*, *L. inadai*, *L. krischneri*, *L. wolffi*, *L. borgpetersenii*, *L. weilii*, *L. noguchii*, *L. licerasiae*, *L. santarosai*, *L. alstonii*, *L. terpstrae* y seis especies saprófitas: *L. biflexa*, *L. ketyi*, *L. meyeri*, *L. yanagawae*, *L. wolbachi* y *L. vanthielii*.²¹

Muchos serovares predominan en mamíferos (hospederos seleccionados), pero la distribución de un serovar específico en un hospedero seleccionado no es exclusiva. La misma especie animal puede ser reservorio primario de varios serovares y también puede ser portadora de tipos que predominan en otros mamíferos.

El punto de acumulación de *Leptospira* en sus hospederos naturales es el lumen de los túbulos nefríticos, de donde pasa a la orina. La persistencia e intensidad de la leptospiuria pueden variar según el hospedero y el serovar que causa la infección. Las ratas de la variedad noruega infectadas con serovar Icterohaemorrhagiae, liberan gran número de leptospirosas durante toda su vida. Las cepas del serovar Canicola son aparentemente menos eficientes para persistir en los riñones de las ratas.²² El número de microorganismos liberados por perros, vacas y cerdos infectados puede ser

Cuadro I. Serogrupos y serovares de *Leptospira interrogans*.

Serogrupo	Serovares
Icterohaemorrhagiae	icterohaemorrhagiae, copenhagen, lai, zimbabwe,
Hebdomadis	hebdomadis, jules, kremastos
Pyrogenes	pyrogenes
Batavia	batavia
Grippotyphosa	grippotyphosa, canalzoniae, ratnapura
Canicola	canicola
Australis	canicola
Pomona	pomona
Javanica	javanica
Serjoe	serjroe, saxkoebing, hardjo
Panama	panama, mangus
Cynopteri	cynopteri
Djasiman	djasiman
Sarmin	sarmin
Mini	mini, georgia
Tarassovi	tarassovi
Ballum	ballum, aroborea
Celledoni	celledoni
Louisiana	louisiana, lanka
Ranarum	ranarum
Manhao	manhao
Shermani	shermani
Hurstbridge	hurstbridge

considerable sólo durante pocos meses después de la infección y es generalmente escaso o nulo después de seis meses.

La leptospirosis humana se asocia principalmente a la exposición ocupacional. Las personas que trabajan con animales o en ambientes infectados por ratas se exponen a riesgos de infección (veterinarios, productores lácteos, cuidadores de cerdos, trabajadores de mataderos, mineros y procesadores de carne de pescado y aves), por lo que se pueden producir grandes pérdidas económicas.²² En diferentes partes del mundo este padecimiento es esporádico o alcanza proporciones epidémicas en los trabajadores agrícolas que cultivan arroz, caña de azúcar, lino y verduras, en

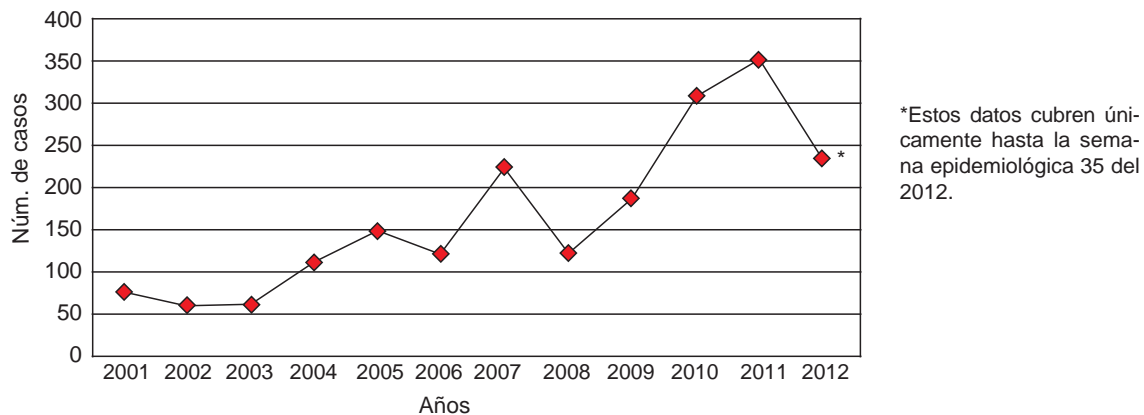


Figura 4. Frecuencia de aislamiento de *Leptospira* de 2001–2012 en México.²⁵ Fuente: Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica/ Dirección General de Epidemiología/SSa.

los trabajadores de las plantaciones de caucho y en los soldados expuestos a medios naturales que se encuentran contaminados. Los riesgos potenciales de infección por bañarse o nadar en estanques, lagunas o arroyos donde pastorean ganados se han demostrado reiteradamente.²³

Epidemiología

La leptospirosis es considerada una enfermedad tanto endémica como epidémica y reemergente.^{19,24} La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado una tasa de incidencia de 4-100 casos por 100,000 habitantes en los países tropicales y subtropicales, con tasa de letalidad que va de 5 a 30%.¹⁹ Constituye un problema de salud pública en aumento como lo demuestra el incremento de brotes a nivel mundial. La incidencia anual de casos graves es de aproximadamente medio millón de humanos, cifra que la pone por encima del dengue hemorrágico y la hantaviriosis severa.^{22,25} A pesar de su importancia, existe una gran subnotificación debido a que pocas veces se piensa en ella, en especial cuando se presenta la forma anictérica de la enfermedad. Su incidencia es dependiente de riesgo laboral, recreación, condiciones ambientales: clima templado, tropical y subtropical,

tipo de suelo y pH neutro o alcalino, así como de la presencia de agua contaminada por desechos procedentes de animales tanto domésticos como silvestres que presentan leptospirosis prolongada (verdaderos reservorios de la infección), que permita mantener viable a las bacterias. Es considerada una enfermedad rural y urbana, con predominio de la primera. La leptospirosis tiene gran impacto en la economía, ya que además de ser una enfermedad ocupacional que afecta a individuos en edad productiva, generando pérdidas por incapacidad y por costos de tratamiento, también es una patología que ataca a los animales domésticos y de granja, lo que genera grandes pérdidas en el comercio de animales por ser causa de múltiples abortos y por afectar la calidad de sus productos (carne, semen y leche).²² En México se inicia el registro de la leptospirosis hasta el año 2000 en el Sistema de Notificación Semanal de Casos Nuevos de Enfermedad Sujetos a Vigilancia Epidemiológica.²⁶ Del 2001 al 2012 se ha generado un reporte de 2,001 casos (*figura 4*). Entre 2003 y 2012, 50% de los casos correspondieron a hombres y 50% a mujeres, lo que indica que el sexo no influye. Entre los cinco estados de la República Mexicana con mayor índice de casos reportados están Chiapas, Veracruz, Sonora, Tabasco y Sinaloa.²⁶

Factores de virulencia

La parte fundamental en el ciclo de vida de *Leptospira* es su capacidad para mantenerse en los túbulos renales de los animales que participan como reservorios.¹⁵ Para ello, se requiere de factores que intervienen en la motilidad y quimiotaxis bacteriana con el fin de que el patógeno alcance el blanco durante la infección. En *L. interrogans*, Copenhagen y Lai se han determinado la existencia de 79 genes asociados a la motilidad. De éstos, existen 42 genes que son comunes a *Treponema pallidum* y *Borrelia burgdorferi*.²⁷ Nascimento y colaboradores refieren la existencia de una mayor complejidad de *L. interrogans* respecto a *T. pallidum* y *B. burgdorferi* en cuanto a quimiotaxis.^{17,27} Reportan la existencia de mayor número de proteínas aceptadoras de grupos metilos (MCP), que a decir de este grupo, la mayor cantidad de genes involucrados en la motilidad pudiera representar una mayor capacidad de adaptación y supervivencia de la bacteria a las condiciones ambientales. *Leptospira* es capaz de realizar la invasión del hospedero haciendo uso de un proceso de translocación en el que participan enzimas degradadoras de las membranas celulares: esfingomielinasa tipo C (serovares; Ballum, Hardjo, Pomona y Tarassovi), fosfolipasa D y hemolisina (*tlyABC*), las cuales son transportadas a la superficie bacteriana a través de sistemas de secreción I y II. Aunado a lo anterior, la bacteria genera un grupo de proteasas que degradan la matriz extracelular de los tejidos: colagenasa, metaloproteasa y varias termolisinas. Además de los sistemas de secreción mencionados, *Leptospira* presenta numerosos transportadores ABC y proteínas de fusión.²⁷⁻³²

En la colonización, la bacteria produce dos familias de adhesinas no fimbriales. La primera tiene tres genes: *ligA*, *ligB* y *ligC*, que codifican para proteínas BIG (*bacterial immunoglobulin-like*), involucradas en la interacción hospedero-patógeno. La segunda familia consiste en tres integrinas (alfa proteínas), cada una con siete secuencias repetidas,

las que al parecer participan en las interacciones con el ligando.²⁷⁻³²

A lo anterior se añade la posible participación de proteínas de membrana integral de *Leptospiras* (OmpL 1, lipoproteínas, LipL4 y LipL32) y proteína de membrana periférica (P31LipL45), algunas de ellas expresadas durante la infección de huésped.²⁹

En *Leptospira* se han encontrado genes involucrados en la biosíntesis de polisacárido capsular; sin embargo, no existen evidencias experimentales en la producción de cápsula, pero se supone que una sustancia parecida a un biofilm le permite colonizar densamente a los túbulos renales.^{1,31} Las cepas aisladas del riñón de ratas con infección crónica contienen abundante lipopolisacáridos (LPS), a diferencia de las aisladas de hígado de hámster, lo que hace pensar en la participación del antígeno O del LPS en la inducción del estado de portador. Se ha referido que la actividad de la endotoxina (lípid A) en estos microorganismos tiene menor potencia comparada con la que se exhibe en las bacterias Gram negativas.^{30,31}

El peptidoglicano o mureína de *Leptospiras* patógenas se encuentra entre las moléculas que pueden activar al endotelio vascular e incrementar la adherencia de neutrófilos, lo que favorece la inflamación tanto local como sistémica.

Patogénesis

Las leptospiras penetran en los hospederos a través de abrasiones de la piel, por mucosas de nasofaringe y esófago o por los ojos e inmediatamente generan una infección sistémica, debido a su paso a través de los tejidos (posiblemente entre las uniones intracelulares) y por vía hemática.¹ Experimentalmente, se ha observado la penetración intracelular de *Leptospira* por translocación de monocapas celulares polarizadas, sin alterar la carga eléctrica transepitelial.^{1,32} Este microorganismo no es una bacteria intracelular facultativa; al parecer, esta observación *in vitro* dentro de las

células (compartimentos citoplasmático y fagosomal), sólo es transitoria en células que no son fagocitos profesionales. Se piensa que este hecho lo usa la bacteria como forma de diseminación hacia el órgano blanco y para evadir la respuesta inmune.^{1,29,31}

La lipoproteína Lip46 se encuentra relacionada con la diseminación de *Leptospira*. La infección causa una leptospiremia prolongada que alcanza diferentes órganos: hígado, riñón, corazón, músculo esquelético e inclusive sistema nervioso central y humor acuoso, que finaliza cuando el hospedero monta una respuesta inmune efectiva que generalmente ocurre entre una a dos semanas después de la exposición.^{1,7,27} Sin embargo, la enfermedad puede recurrir después de tres a cuatro días, produciendo una enfermedad bifásica.¹²

La mayoría de los procesos infecciosos por *Leptospira* cursan en forma asintomática o con manifestaciones clínicas inespecíficas y autolimitadas en un plazo de cuatro a siete días.

La enfermedad de Weil representa la forma severa de la leptospirosis, caracterizada por la presencia de fiebre elevada, ictericia, sangrado, disfunción renal y pulmonar, alteraciones neurológicas y colapso cardiovascular, con curso clínico variable.

La respuesta inmune en el control de la infección

La participación de la respuesta inmune frente a la presencia de *Leptospira* es de tipo humoral y se encuentra dirigida al serovar infectante; de ahí que la participación de anticuerpos específicos facilita la fagocitosis de la bacteria. Fenómeno que se pone en evidencia durante la segunda fase de la leptospirosis o también llamada inmune, durante la cual se produce la desaparición de *Leptospira* de circulación.²⁷ Sin embargo, la formación de complejos inmunes agrava el padecimiento, ya que éstos llevan a un proceso inflamatorio, como se ha referido que ocurre en el sistema nervioso

central. Existen datos que apoyan evidencias de reacción cruzada de anticuerpos contra el tejido ocular, antiplaquetarios, anticardiolipina. Se ha descrito la participación del LPS de esta bacteria en la apoptosis de linfocitos vía inducción del factor de necrosis tumoral tipo alfa (TNF- α), este último se registra elevado en pacientes con leptospirosis.¹

La respuesta inmune celular en el paciente se encuentra suprimida, con reducción de linfocitos CD4⁺.⁴

Manifestaciones clínicas

La leptospirosis tiene un periodo de incubación de siete a 14 días, con un rango que va de dos a 30 días. Se caracteriza por presentar un amplio espectro de manifestaciones clínicas. Durante la fase aguda, la enfermedad puede ser asintomática o subclínica y sintomática anictérica o icterica.³⁰

Forma anictérica: Las manifestaciones clínicas varían desde leves hasta graves e incluso mortales, como es el caso de la leptospirosis hemorrágica pulmonar. Se calcula que 90% de los casos sintomáticos sufren de esta variante con o sin meningitis asociada. Puede presentarse como un proceso gripal con febrícula o fiebre, cefalea intensa, escalofríos, mialgias (especialmente en las pantorrillas y abdomen), náusea y vómito. También se presenta como una enfermedad discreta, de corta duración, caracterizada por ser bifásica, ya que cuenta con una fase febril o leptospirémica y una fase inmune o leptospiúrica.

La primera fase se caracteriza por la presencia de fiebre elevada (> 38 °C) de carácter remitente, con duración de hasta tres semanas, escalofríos, mialgias (regiones paravertebrales, caderas, pantorrillas y abdomen), cefalea que puede ser frontal o dolor retroauricular, conjuntivitis, hemorragia conjuntival. Anorexia, náuseas y vómito que generalmente se presentan en la mitad de los pacientes, constipación o diarrea. La gravedad de las manifestaciones clínicas se evidencia por la pre-

sencia de melena o enterorragia. La hepatomegalia y esplenomegalia pueden ocurrir, aunque es raro. En esta fase se encuentra a *Leptospira* en líquido cefalorraquídeo (LCR) y sangre.

El paciente puede curar después de uno a tres días de estar afebril con aparente recuperación; evoluciona a la segunda fase (inmune), reapareciendo la fiebre y síntomas localizados en diferentes órganos. En las formas anictéricas, la principal manifestación es la meningitis, caracterizada por cefalea intensa y persistente, vómitos y signos de irritación meníngea. Existen manifestaciones hemorrágicas en diferentes localizaciones. En las formas graves, el distrés respiratorio y la hemoptisis pueden causar la muerte. En esta fase las manifestaciones clínicas desaparecen de una a tres semanas.

En general, tanto los individuos asintomáticos como los sintomáticos leves no son diagnosticados y sólo son detectados durante los estudios epidemiológicos, en los brotes o estudios de caso.

Forma ictérica se presenta en 5 a 10% de los casos. La forma hepatonefrótica o síndrome de Weil es la forma más grave con disfunción hepática y renal, alteraciones hemorrágicas, hemodinámicas, cardíacas y pulmonares, con letalidad de 5 a 20%. El curso clínico rara vez es bifásico, más bien es continuo, con signos y síntomas semejantes a la forma anictérica, pero más intensos. La ictericia se presenta entre el tercero y séptimo día de la enfermedad, siendo progresiva, con dolor a la palpación en hipocondrio derecho y hepatomegalia leve o moderada en 70% de los casos, con incremento de las transaminasas hasta cinco veces por arriba del valor normal; la muerte rara vez ocurre por insuficiencia hepática. En pacientes graves se puede presentar tos, disnea y hemoptisis. El compromiso renal es variable, pudiendo presentar sólo albuminuria y hematuria, así como insuficiencia renal grave con oliguria progresiva, deshidratación hasta llegar a anuria. Ante el fracaso renal, la azoemia alcanza su máximo entre el quinto y séptimo día, acompañándose de náuseas, vómito y obnubilación

progresiva y finalmente coma. Entre otras causas de muerte se encuentran arritmia, falla cardíaca, hemorragia adrenal, sangrado masivo del aparato digestivo y tracto respiratorio. En casos no severos, la recuperación tiene lugar en la segunda semana, aunque algunas manifestaciones clínicas se prolongan más tiempo.

Leptospirosis crónica. Se considera que la recuperación de la fase aguda puede durar meses o años y quedar con secuelas a largo plazo, las cuales incluyen fatiga crónica y otros síntomas neuropsiquiátricos como cefalea, parestias, parálisis, cambios de carácter, síndrome obsesivo-compulsivo, depresión, encefalitis parainfecciosa, afectación hepatobiliar, urinaria, cardiovascular^{19,33-36} y complicaciones oculares como la uveítis e iridociclitis que son la presentación tardía de la enfermedad atribuida a la persistencia de las *Leptospiras* en los ojos, en donde están protegidas de la respuesta inmune del huésped.^{33,36,37} Sin embargo, algunos autores han seguido la evolución de estos pacientes y han logrado el aislamiento de la bacteria meses o años después de la presentación de la fase aguda, lo que comprueba la existencia de la fase persistente o crónica.^{35,38,39}

La leptospirosis crónica se define como un síndrome multiorgánico, clínicamente polimórfico, manifestado comúnmente por fatiga crónica, cefalea, hipersomnia, dolor en globos oculares, mialgias, artralgias, depresión y las molestias del órgano o sistema más afectado: hígado, riñón, pulmón, sistema nervioso central, etcétera.

La leptospirosis persistente o crónica puede carecer de antecedentes clínicos de la enfermedad aguda por haber cursado en forma subclínica o sintomática leve, por lo que el Centro de Información de Leptospirosis cita: «si la fase aguda ha sido pasada por alto, el diagnóstico de la fase persistente raya en lo milagroso».

Sin embargo, al igual que sucede en los animales, la leptospirosis crónica se caracteriza por presentar títulos de anticuerpos $\leq 1:100$, títulos que están por debajo del título significativo tomado para el diagnóstico de la fase aguda.^{36,40}

Complicaciones

Frecuentemente la *Leptospira* produce enfermedad hemorrágica de pulmones y otras vísceras, así como anemias, púrpuras y hemorragias mucocutáneas, e inclusive parece evolucionar con cuadros mieloproliferativos y la sospecha de causar enfermedad autoinmune, además de poder afectar cualquier órgano. A pesar de esto, prácticamente nunca se le busca en médula ósea, donde por diversos mecanismos, podría, en teoría, causar graves problemas hemorrágicos, e inclusive neoplasias a sus huéspedes (*Leptospira* asociada a cáncer de colon).

Las complicaciones más encontradas son insuficiencia renal aguda, síndrome de dificultad respiratoria del adulto, falla hemodinámica, hemorragias y coma.²

En el caso de la leptospirosis crónica, ésta puede agudizarse paulatina o súbitamente evolucionando a síndrome de Weil, encefalitis, neumonía hemorrágica, miocarditis, diátesis hemorrágica, etc., la que agravada por el deterioro inmunológico del paciente, sólo se diferencia de la fase aguda por el título bajo de anticuerpos que el enfermo logra producir, lo que dificulta grandemente el diagnóstico cuando no se piensa en ella. El diagnóstico diferencial se realiza con los siguientes padecimientos: dengue clásico y hemorrágico, paludismo, brucelosis, pielonefritis, hepatitis viral y meningitis.²⁰

Sin embargo, al igual que la sífilis y la borreliosis, puede ser «la gran simuladora», ya que puede confundirse con diversas enfermedades infecciosas.

Diagnóstico de laboratorio

El diagnóstico clínico debe ser confirmado por medio de pruebas de laboratorio, ya que los signos y síntomas en esta infección son frecuentemente atípicos. En la Guía para el Diagnóstico, Vigilancia y Control de Leptospirosis Humana, publicado por la Organización Panamericana de la Salud (OPS), Organización Mundial de la Salud (OMS) y la In-

ternational Leptospirosis Society (ILS) en el 2008, se dan una serie de recomendaciones referentes al manejo a nivel de laboratorio del paciente infectado por *Leptospira*, que sin ser un manual, como lo refiere la Guía, proporciona información suficiente, además de bibliografía para los detalles técnicos.¹⁹

Entre las pruebas se incluyen técnicas serológicas para la detección de anticuerpos (serodiagnóstico); cultivo y observación de la bacteria a partir de sangre, orina, LCR y tejidos; detección de antígenos en tejidos y biología molecular.¹³

A) **Técnicas serológicas.** La prueba de aglutinación microscópica (MAT) y el inmunoensayo enzimático (ELISA), son los métodos de laboratorio comúnmente empleados en el diagnóstico serológico.⁷

La prueba de aglutinación microscópica (MAT) es considerada la prueba de referencia. Para su realización se emplea suero problema a diferentes diluciones, cultivo de diversas cepas de referencia de *Leptospira*, así como microscopio de campo oscuro para evaluar el grado de la aglutinación. Esta prueba permite determinar el o los serogrupos responsables del proceso infeccioso y el título del suero para cada antígeno probado. Generalmente es positiva entre los 10 a 12 días después de la presentación de los primeros síntomas y signos clínicos. Sin embargo, puede ocurrir seroconversión entre el quinto y séptimo día después de la aparición de la enfermedad. Tiene excelente especificidad, pero menor sensibilidad. Títulos a partir de 1:80 son considerados sospechosos de leptospirosis. Para su confirmación se requiere de una segunda muestra (no antes de dos semanas posteriores) en la cual el título debe aumentar cuatro veces más que el inicial.¹⁹

La prueba de ELISA es extremadamente sensible, puede detectar IgM durante la primera semana de la enfermedad antes que la MAT, aunque puede llegar a ser negativa más tempranamente.

Otras técnicas serológicas empleadas distintas al MAT y ELISA son: Dipsticks (LEPTO Dip-S-Tick,

Lepto Tek Lateral Flow), aglutinación en látex seco (Lepto Tek Dri- Dot), inmunofluorescencia indirecta, aglutinación en microcápsula, aglutinación macroscópica con antígeno termorresistente, así como la prueba de fijación de complemento, aglutinación con látex, aglutinación macroscópica en portaobjeto y prueba de lisis de eritrocitos sensibilizados.¹⁹

B) Cultivo. Se debe considerar la fase en que se encuentra la infección. Por lo general, durante la fase aguda, la bacteria se localiza en circulación durante los primeros siete a 10 días de la enfermedad, momento adecuado para realizar el muestreo y cultivo de sangre heparinizada. El LCR puede ser cultivado durante los primeros 10 días de la enfermedad, en tanto que la orina lo es a partir de la segunda a la cuarta semana de la enfermedad.^{7,19} Los medios de cultivo empleados son los siguientes: medio líquido de Ellinghaus y McCullough modificado por Johnson y Harris (EMJH), suplementado con Tween80/albúmina y 5-fluorouracilo, medio de Korthof-Babudieri, medio de Fletcher, etcétera.¹⁹

C) Observación de *Leptospira* mediante microscopio de campo oscuro. Se realiza a partir de muestra clínica: sangre, orina; biopsia hepática, de riñón y pulmón; muestra de LCR durante la fase aguda de la enfermedad.

D) Estudios con biología molecular. Entre las técnicas empleadas se encuentra la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la cual es altamente sensible, los blancos a amplificar son segmentos del ARNr 16S, 23S, genes *secY* y *flaB*, así como secuencias de inserción (IS1533). Con el empleo de iniciadores específicos y la detección del producto amplificado, se ha realizado por electroforesis en geles de agarosa, teñidos con bromuro de etidio, el uso de sondas específicas, marcadas para hibridar el segmento amplificado, incrementando la sensibilidad de la PCR. El producto también ha sido sometido al tratamiento con enzimas de restricción, que en algunos casos ha permitido la diferenciación de cepas patógenas de no patógenas.

En el estudio epidemiológico de *Leptospiras*, la tipificación molecular se inicia con estudios de la composición y homología del ADN genómico a finales de la década de los 60's, alineación del ADN genómico, uso de PCR, PCR-anidado, análisis con empleo de enzimas de restricción (REA), polimorfismo de fragmentos de restricción (PCR-RFLP), ribotipificación, electroforesis en gel en campo pulsado (PFGE), amplificación al azar del ADN (RAPD), entre otros³ (figura 5).

E) Empleo de animales de experimentación (cobayos jóvenes de 150-175 g y hámsteres dorados de cuatro a seis semanas de edad) para el aislamiento indirecto de *Leptospira* con muestras de sangre y orina. La determinación se realiza a través de la obtención del líquido peritoneal observado por microscopía de campo oscuro. En caso de positividad se realiza hemocultivo. Este procedimiento de investigación tiene en la actualidad poco uso.

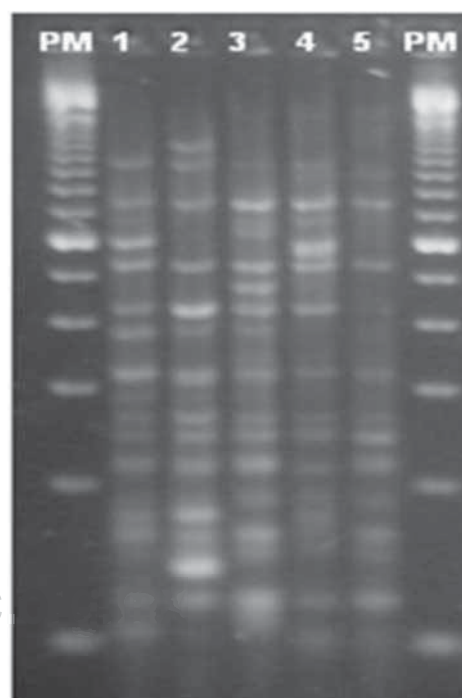


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 2.5% de productos de RAPD, con empleo de iniciadores B11 y B12 de serovares de *Leptospira interrogans*.

F) **Tinción con sales de plata.** Whartin-Starry, Fontana modificado.

G) **Inmunotinción.** Detección de antígenos mediante Inmunofluorescencia indirecta o inmunohistoquímica.

Control y prevención

La leptospirosis es una enfermedad difícil de controlar debido a la capacidad del microorganismo para ser eliminada por la orina de muchos animales que se mantienen en estado de portador.

En el control se incluye: notificación del caso, aislamiento de pacientes, desinfección de artículos contaminados con orina, investigación de los contactos y existencia de probables fuentes de infección.¹⁹

Entre las medidas de protección se encuentran las siguientes: evitar contacto con aguas probablemente contaminadas, evitar bañarse en agua de ríos o estancada, utilizar métodos de barrera que protejan piel y mucosas como el empleo de ropa de trabajo adecuada, botas y guantes, control de roedores y de animales de importación, realizar la separación, tratamiento y sacrificio de animales enfermos. Realizar construcciones a prueba de roedores, consumir agua hervida si no se dispone de agua potable. Algunas de estas medidas dan resultados relativos, en tanto que con otras el resultado es más positivo.¹⁹

Las vacunas inactivadas se emplean en animales, en especial en perros, en los que se evita la infección, pero no el estado de portador. Sin embargo, se han observado humanos infectados por animales vacunados. Hay que recordar que existen diferentes serovares y la vacuna puede no tener el que se necesita, de ahí que el empleo de vacunas es limitado.¹⁹

Tratamiento

Éste se encuentra dirigido principalmente a realizar una terapia de soporte, corrección del des-

equilibrio hidroelectrolítico y ácido-básico, sobre todo en las formas graves del padecimiento. El tratamiento antimicrobiano se debe iniciar lo más temprano posible, ya que se encuentra orientado a controlar la infección antes de que se presente daño irreparable en el organismo, sobre todo en riñón e hígado y el desenlace sea fatal.

En leptospirosis no complicada y con tolerancia oral, el tratamiento de elección en niños mayores de ocho años es la doxiciclina a dosis de 100 mg cada 12 horas por siete días. En menores de ocho años la amoxicilina a dosis de 30 a 50 mg/kg al día divididos en cuatro dosis por siete días. También puede ser empleada la eritromicina 25-50 mg/kg por día divididos en cuatro dosis por siete días. En casos de moderados a graves, se instituye la administración de penicilina G sódica alrededor de 20 millones de UI/día por vía intravenosa (IV), por siete a 10 días. Como alternativa se puede usar ampicilina 0.5 g cada seis horas por la misma vía. La penicilina benzatínica en adultos se recomienda 1'200,000 a 2'400,000 UI, vía intramuscular (IM) cada 24 horas, en niños 25,000 a 50,000 UI/kg, IM cada 24 horas durante siete a 10 días. La ceftriaxona también puede ser empleada de 1 a 2 g cada 12 horas vía IV o IM. Igualmente se recomienda el empleo de trimetoprim con sulfametoxazol 80/400 mg. En adultos dos tabletas cada 12 horas y en niños 8/40 mg/kg/día, en dos administraciones durante 10 días.

Quimioprofilaxis: Ante el peligro de una exposición a *Leptospira*, se recomienda la administración de doxiciclina 200 mg por semana.

Después de la exposición al riesgo, doxiciclina 100 mg cada 12 horas por cinco a siete días.

Referencias

1. Levett PN. Leptospirosis. Clin Microbiol Rev 2001; 14: 296-326.
2. Dolhnikoff M, Mauad T, Bethlem EP, Ribeiro CR. Pathology and pathophysiology of pulmonary manifestations in leptospirosis. Bras J Infect Dis 2007; 11: 142-148.
3. Erosa-Barbachano G. Leptospirosis. Rev Biomed 2001; 12: 282-287.
4. Terpstra WJ. Historical perspectives in leptospirosis. Indian J Med Microbiol 2006; 24: 316-320.

5. Wood WB. Enfermedad de Weil. En: Cecil, Rusell, (eds). Tratado de Medicina Interna. México: Interamericana, 1947: 578-583.
6. Noguchi H, Kligler J. Experimental studies on yellow fever occurring in Merida. Yucatán. J Exp Med 1920; 32: 601-625.
7. Noguchi H, Kligler J. Immunological studies with a strain of *Leptospira* isolated from a case of yellow fever in Merida, Yucatán. J Exp Med 1920; 32: 627-637.
8. Varela G, Zavala VJ. Estudio serológico de la leptospirosis en la República Mexicana. Rev Inst Salubr Enf Trop 1961; 21: 49-52.
9. De Igartua LE, Coutiño RMR, Velásco CO. Revisión breve de leptospirosis en México. Altepapaktlí Salud para la Comunidad 2005; 1: 52-58.
10. Caballero SA, Romero GJ. Leptospirosis en México. Premio Canifarma. Ind Farmaceut Vet 1991; 1: 107-124.
11. Gavaldón DG, Cisneros MA, Rojas N, Moles-Cervantes LP. La importancia de la leptospirosis humana en México. Detección de anticuerpos antileptospira en una población de donadores de sangre. Gac Med Mex 1995; 131: 289-292.
12. Navarrete-Espinosa J, Acevedo-Vales J, Huerta-Hernández E, Torres-Barranca J, Gavaldón-Rosas DG. Prevalencia de anticuerpos contra dengue y *Leptospira* en la población de Jáltipan, Veracruz. Sal Pub Mex 2006; 48: 220-228.
13. Navarrete-Espinosa J, Moreno-Muñoz M, Rivas-Sánchez B, Velásco-Castrejón O. Leptospirosis prevalence in a population of Yucatan, Mexico. J Pathogens 2011. Article ID: 408604, 5p, Doi: 10.4061/2011/408604.
14. Dong H, Hu Y, Xue F, Sun D, Oicius DM, Mao Y et al. Characterization of the ompL1 gene of pathogenic *Leptospira* species in China and cross-immunogenicity of the OmpL1 protein. BMC Microbiol 2008; 8: 223-234.
15. Ko AI, Goarant C, Picardeau. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. Nat Rev Microbiol 2009; 7: 736-747.
16. Trueba G, Zapata S, Madrid K, Cukken O, Haake D. Cell aggregation a mechanism of pathogenic *Leptospira* to survive in fresh water. Int Microbiol 2004; 7: 35-40.
17. Rodríguez I, Rodríguez JE, Fernández C. Alcalinización de la orina humana para el aislamiento experimental de *Leptospiras*. Rev Cubana Med Trop 2005; 57: 55-56.
18. Abuauda MC, Osorio SG, Rojas PML, Lorena-Pino V. Leptospirosis: Presentación de una infección fulminante y revisión de la literatura. Rev Chil Infect 2005; 22: 93-97.
19. Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud e International Leptospirosis Society. Leptospirosis humana: Guía para el diagnóstico, vigilancia y control. Serie de Manuales Técnicos, 12. VP/OPS/OMS, 2008. Disponible en: www2paho.org/hq/dndocuments/WHO-Guia-Lepto-2003-spa.pdf
20. Céspedes ZM. Leptospirosis: Enfermedad zoonótica reemergente. Rev Peru Med Exp Salud Pública 2005; 22: 290-307.
21. Brihuega B. Leptospirosis: Diagnóstico y tipificación de *Leptospiras*. En: Cacchione R, Durlach R, Martino P (eds). Tema de Zoonosis IV. Buenos Aires, Arg: Asociación Argentina de Zoonosis, 2008: 224-227.
22. Hartskeer IRA. International Leptospirosis Society. Objectives and achievements. Rev Cub Med Trop 2005; 57: 7-10.
23. Vijayachari P, Sugunan Ap, Shriram AM. Leptospirosis: an emerging global public health problem. J Biosci 2008; 33: 557-569.
24. World Health organization. 1999. Leptospirosis worldwide, 1999. Wkly Epidemiol Rec 1999; 74: 237-242.
25. Hartskeer IRA, Collares-Pereira M, Ellis WA. Emergence, control and re-emerging leptospirosis; dynamics of infection in the changing world. Clin Microbiol Infect 2001; 494-501.
26. Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica/ Dirección General de Epidemiología/SSA. Boletín epidemiológico.
27. Nascimento LTO, Ko AI, Martins AEL, Monteiro-Vitorello CB, Ho PL, Haake DA et al. Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveal novel insights into physiology and pathogenesis. J Bacteriol 2004; 186: 2164-2172.
28. Lin Y-P, McDonough SP, Sharma Y, Chang Y-E. The terminal immunoglobulin-like repeats of LigA and LigB of *Leptospira* enhance their binding to gelatin binding domain of fibronectin and host cells. Plus One 2010; 5(6):e11301.
29. Matsunaga J, Barocchi MA, Croda J, Young TY, Sánchez Y, Siqueira I et al. Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. Mol Microbiol 2003; 49: 929-945.
30. Cinco M. New insights into the pathogenicity of leptospires: evasion of the host defences. New Microbiologic. 2010; 33: 283-292.
31. Nally JE, Choe E, Fishbein MC, Blanco DR, Lovett MA. Changes in lipopolysaccharide O antigen distinguish acute versus chronic *Leptospira interrogans* infections. Infect Immun 2005; 73: 3251-3260.
32. Barocchi MA, Ko AI, Reis MG, McDonald KI, Tiley LW. Rapid translocation of polarized MDCK cell monolayers by *Leptospira interrogans*, an invasive but nonintra-cellular pathogen. Infect Immun 2002; 70: 6926-6932.
33. Faine S. *Leptospira* and leptospirosis. Boca Ratón, Florida: CRC Press, 1994: 353.
34. Velasco-Castrejón O. Seguimiento de pacientes con leptospirosis crónica. Mem Symp Importancia de la Leptospirosis como una zoonosis reemergente en México. México ISB: Coordinación de Vigilancia Epidemiológica, Ssa, 1998: 9-12.
35. Avdeeva MG. Outcome and tendency of late convalescence in icterohaemorrhagic leptospirosis. Klin Med (Mosk) 2003; 81: 42-47.
36. Rathinam SR. Ocular manifestations of leptospirosis. J Postgrad Med 2005; 51: 189-194.
37. Elizalde 2004 Elizalde CAA, Tenorio GG, Velasco-Castrejón O. Identificación de *Leptospira* en la patogénesis de la uveítis crónica en la Ciudad de México. Rev Mex Oftalmol 2004; 78: 165-170.
38. Nicolesco M, Andrescu N. May human leptospirosis develops as a chronic infection? Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Htg 1984; 257: 531-534.
39. Velasco-Castrejón O, Rivas-Sánchez B, Rivera-Reyes HH. Transición de la leptospirosis aguda a crónica. Seguimiento de siete casos. Rev Mex Patol Clin 2009; 56: 183-192.
40. OIE. Leptospirosis (Chapter 2.2.4). In: Manual of diagnostic test and vaccines for terrestrial animals. 5th ed., 2004. Available in: www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/

Instrucciones para los autores

La **Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio** es el órgano oficial de difusión de la Federación Mexicana de Patología Clínica (FEMPAC) y de la Asociación Latinoamericana de Patología Clínica/Medicina de Laboratorio (ALAPAC/ML). La revista publica artículos originales, casos clínicos, temas de revisión, informe de casos clínicos, notas de historia, editoriales por invitación, cartas al editor y noticias varias de la FEMPAC y la ALAPAC/ML. Para su aceptación, todos los artículos son analizados inicialmente al menos por dos revisores y finalmente ratificados por el Comité Editorial.

La **Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio** acepta, en términos generales, las indicaciones establecidas por el *International Committee of Medical Journal Editors* (ICMJE). La versión actualizada de los *Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals* se encuentra disponible en www.icmje.org. Una traducción al español de esta versión de los Requisitos de uniformidad para los manuscritos remitidos a las publicaciones biomédicas se encuentra disponible en: www.medigraphic.com/requisitos

El envío del manuscrito implica que éste es un trabajo que no ha sido publicado (excepto en forma de resumen) y que no será enviado a ninguna otra revista. Los artículos aceptados serán propiedad de la **Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio** y no podrán ser publicados (ni completos, ni parcialmente) en ninguna otra parte sin consentimiento escrito del editor. El autor principal debe guardar una copia completa del manuscrito original.

Los artículos deberán enviarse al editor de la **Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio**, a la dirección electrónica: enavarrete@medigraphic.com

Los requisitos se muestran a continuación en la lista de verificación. El formato se encuentra disponible en www.medigraphic.com/patologiaclinica/instrucciones (PDF). Los autores deberán descargarla e ir marcando cada apartado una vez que éste haya sido cubierto durante la preparación del material para publicación.

La lista de verificación en formato PDF deberá enviarse junto con el manuscrito, también deberá adjuntar la forma de transferencia de derechos de autor. Los manuscritos inadecuadamente preparados o que no sean acompañados de la lista de verificación serán rechazados sin ser sometidos a revisión.

ASPECTOS GENERALES

- Los artículos deben enviarse en formato electrónico. Los autores deben contar con una copia para su referencia.
- El manuscrito debe escribirse con tipo arial tamaño 12 puntos, a doble espacio, en formato tamaño carta, con márgenes de 2.5 cm en cada lado. La cuartilla estándar consiste en 30 renglones, de 60 caracteres cada renglón (1,800 caracteres por cuartilla). Las palabras en otro idioma deberán presentarse en letra itálica (cursiva).
- El texto debe presentarse como sigue: 1) página del título, 2) resumen y palabras clave [en español e inglés], 3) introducción, 4) material y métodos, 5) resultados, 6) discusión, 7) agradecimientos, 8) referencias, 9) apéndices, 10) texto de las tablas, 11) pies de figura. Cada sección se iniciará en hoja diferente. El formato puede ser modificado en artículos de revisión y casos clínicos, si se considera necesario.
- Numeración consecutiva de cada una de las páginas, comenzar por la página del título.
- Anote el nombre, dirección y teléfono de tres probables revisores, que no pertenezcan a su grupo de trabajo, a los que se les puede enviar su artículo para ser analizado.

72

TEXTO

Página de título

- Incluye:
 - 1) Título en español e inglés, de un máximo de 15 palabras y título corto de no más de 40 caracteres,
 - 2) Nombre(s) de los autores en el orden en que se publicarán, si se anotan los apellidos paterno y materno [pueden aparecer enlazados con un guión corto],
 - 3) Créditos de cada uno de los autores,
 - 4) Institución(es) donde se realizó el trabajo y
 - 5) Dirección para correspondencia: domicilio completo, teléfono, fax y dirección electrónica del autor responsable.

Resumen

- En español e inglés, con extensión máxima de 200 palabras.
- Estructurado conforme al orden de información en el texto:
 - 1) Introducción,
 - 2) Objetivos,
 - 3) Material y métodos,
 - 4) Resultados y
 - 5) Conclusiones
- Evite el uso de abreviaturas, pero si fuera indispensable su empleo, deberá especificarse lo que significan la primera vez que se citen. Los símbolos y abreviaturas de unidades de medidas de uso internacional no requieren especificación de su significado.
- Palabras clave en español e inglés, sin abreviaturas; mínimo tres y máximo de seis.

Texto

- Manuscrito que no exceda de 10 páginas, dividido en subtítulos que faciliten la lectura.
- Deben omitirse los nombres, iniciales o números de expedientes de los pacientes estudiados.
- Se aceptan las abreviaturas, pero deben estar precedidas de lo que significan la primera vez que se citen y las de unidades de medidas de uso internacional a las que está sujeto el gobierno mexicano.
- Los fármacos, drogas y sustancias químicas deben denominarse por su nombre genérico, la posología y vías de administración se indicarán conforme a la nomenclatura internacional.
- Al final de la sección de material y métodos se deben describir los métodos estadísticos utilizados.

Reconocimientos

- Los agradecimientos y detalles sobre apoyos, fármaco(s) y equipo(s) proporcionado(s) deben citarse antes de las referencias. Enviar permiso por escrito de las personas que serán citadas por su nombre.

Referencias

- Se identifican en el texto con números arábigos y en orden progresivo de acuerdo a la secuencia en que aparecen en el texto.

- Las referencias que se citan solamente en los cuadros o pies de figura deberán ser numeradas de acuerdo con la secuencia en que aparezca, por primera vez, la identificación del cuadro o figura en el texto.
- Las comunicaciones personales y datos no publicados, serán citados sin numerar a pie de página.
- El título de las revistas periódicas debe ser abreviado de acuerdo al *Catálogo de la National Library of Medicine* (NLM): disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/journals> (accesado 4/Mar/13). Se debe contar con información completa de cada referencia, que incluye: título del artículo, título de la revista abreviado, año, volumen y páginas inicial y final. Cuando se trate de más de seis autores, deben enlistarse los seis primeros y agregar la abreviatura *et al.* Ejemplos:

Artículo de publicaciones periódicas:

Díaz PP, Olay FG, Hernández GR, Cervantes-Villagrana RD, Presno-Bernal JM, Alcántara GLE. Determinación de los intervalos de referencia de biometría hemática en población mexicana. *Rev Latinoamer Patol Clin* 2012; 59 (4): 243-250.

Libros, anotar edición cuando no sea la primera:

Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. *Medical microbiology*. 4th ed. St. Louis: Mosby; 2002.

Capítulo de libro:

Meltzer PS, Kallioniemi A, Trent JM. Chromosome alterations in human solid tumors. In: Vogelstein B, Kinzler KW, editors. *The genetic basis of human cancer*. New York: McGraw-Hill; 2002. p. 93-113.

Para más ejemplos de formatos de las referencias, los autores deben consultar: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Cuadros

- No tiene.
- Sí tiene.
Número (con letra): _____

- La información que contienen no se repite en el texto o en las figuras. Como máximo se aceptan 50 por ciento más uno del total de hojas del texto.
- Están encabezados por el título y marcados en forma progresiva con números romanos de acuerdo con su aparición en el texto.
- El título de cada cuadro por sí solo explica su contenido y permite correlacionarlo con el texto acotado.

Figuras

- No tiene.
- Sí tiene.
Número (con letra): _____
- Se consideran como tales las fotografías, dibujos, gráficas y esquemas. Los dibujos deberán ser diseñados por profesionales. Como máximo se aceptan 50 por ciento más una del total de hojas del texto.
- La información que contienen no se repite en el texto o en las tablas.
- Se identifican en forma progresiva con números arábigos de acuerdo con el orden de aparición en el texto, recordar que la numeración progresiva incluye las fotografías, dibujos, gráficas y esquemas. Los títulos y explicaciones se presentan por separado.

Las imágenes salen en blanco y negro en la versión impresa de la revista. Sin embargo, si las imágenes enviadas son en color, aparecerán así (en color) en la versión electrónica de internet. Si el autor desea que también se publiquen en color en la versión impresa, deberá pagar lo correspondiente de acuerdo con la casa editorial.

Fotografías

- No tiene.
- Sí tiene.
Número (con letra): _____
en color: _____
- Serán de excelente calidad, blanco y negro o en color. Las imágenes deberán estar en formato JPG (JPEG), sin compresión y en resolución mayor o igual a 300 ppp Las dimensiones deben ser al menos las de tamaño postal (12.5 x 8.5 cm), (5.0 x 3.35 pulgadas). deberán evitarse los contrastes excesivos.
- Las fotografías en las que aparecen pacientes identificables deberán acompañarse de permiso escrito

para publicación otorgado por el paciente. De no ser posible contar con este permiso, una parte del rostro de los pacientes deberá ser tapado sobre la fotografía.

- Cada una estará numerada de acuerdo con el número que se le asignó en el texto del artículo.

Pies de figura

- No tiene.
- Sí tiene.
Número (con letra): _____
- Están señalados con los números arábigos que, conforme a la secuencia global, les corresponde.

Aspectos éticos

- Los procedimientos en humanos deben ajustarse a los principios establecidos en la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial (AMM) y con lo establecido en La ley General de Salud (Título Quinto) de México, así como con las normas del Comité Científico y de Ética de la institución donde se efectuó.
- Los experimentos en animales se ajustan a las normas del *National Research Council* y a las de la institución donde se realizó.
- Cualquier otra situación que se considere de interés debe notificarse por escrito a los editores.

Transferencia de Derechos de Autor

Título del artículo: _____

Autor (es): _____

Los autores certifican que el artículo arriba mencionado es trabajo original y que no ha sido previamente publicado. También manifiestan que, en caso de ser aceptado para publicación en la **Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio**, los derechos de autor serán propiedad de esta revista.

Nombre y firma de todos los autores

Lugar y fecha: _____